

28
29



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**CARACTERIZACIÓN DE CLONAS DE cDNA
DE UN GÉN INVOLUCRADO EN EL
DESARROLLO DEL CLOROPLASTO DE**

Arabidopsis thaliana

T E S I S

QUE PRESENTA:

GABRIELA PEDRERO HERNANDEZ

PARA OBTENER EL GRADO DE:

QUIMICA

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

MEXICO, D. F. 1994





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.



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

Jurado asignado

Presidente	Prof:	GUADALUPE VELEZ PRATT
Vocal	Prof:	PATRICIA LEON MEJIA
Secretario	Prof:	JORGE MANUEL VAZQUEZ RAMOS
1er. suplente	Prof:	HOMERO HERNANDEZ MONTES
2do. suplente	Prof:	JESUS FERNANDO MONTIEL AGUIRRE

Este tema se desarrolló en el Departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología U. N. A. M.

Asesor: Dra. Patricia León Mejía

Sustentante: Gabriela Pedrero Hernández

Gabriela Pedrero H--

Al concluir esta etapa de mi vida doy gracias:

**Al corazón de mis padres Rafael y Gisela,
a mis hermanos Ale y Héctor,
a todos mis tíos y primos,
a mis antecesores,
a la sonrisa y la crítica de mis amigos,
a la serenidad que me prestó el mar en los momentos difíciles,
al canto de la selva que endulzó el sentido de mi vida,
a los maestros, escultores de mi formación,
al amor, el dolor y el miedo con quienes combatí para poder llegar aquí.**

Gabriela Pedrero Hernández

INDICE

INTRODUCCION	1
I.- Generalidades	1
II.- Tipos de plástidos	5
III.- Estructura de cloroplasto	8
IV.- Fotosíntesis	12
1) Definición y reacción	12
2) Fase luminosa	12
2.1) Fotosistema II	14
2.2) Fotosistema I	16
2.3) Flujo cíclico de electrones	17
3) Centro de reacción en bacterias fotosintéticas	17
4) Fase oscura. Metabolismo de asimilación de carbono ..	1
5) Organización de genes fotosintéticos en bacterias	22
V.- Utilización de mutantes	23
VI.- Antecedentes	25
OBJETIVOS	26
MATERIALES Y METODOS	27
I Soluciones y medios de cultivo	29
II Protocolos	33
1) Obtención de DNA de tejido vegetal	33
2) Extracción de RNA	34

3) Purificación de plásmido	35
4) Mapeo	36
5) Transferencia	37
6) Marcaje radiactivo de una sonda	37
7) Prehibridación	38
8) Hibridación DNA-DNA	38
9) Hibridación RNA-DNA	39
10) Aislamiento de clonas de cDNA	39
11) Secuenciación	40
12) Transformación por cloruro de calcio	42
RESULTADOS	44
I Aislamiento de clonas de cDNA de bancos en λ	44
II Mapeo de clonas de cDNA	47
III Secuencia	48
IV Análisis de la expresión del gen <i>l-19</i>	56
DISCUSION	61
BIBLIOGRAFIA	66

INTRODUCCION

I.- GENERALIDADES

Aunque no sabemos si la investigación básica que se realiza tendrá aplicación práctica mas tarde, en la mejoría de la salud humana, condiciones de vida, economía o medio ambiente, esta debe realizarse para alimentar el conocimiento humano. Debemos tomar conciencia de que por muchos años el ser humano ha atentado contra los ecosistemas y los ha dañado, en muchos casos irreversiblemente, aún formando parte de ellos. Necesitamos comprometernos con la naturaleza y evitar en la medida de nuestras posibilidades el continuar deteriorando aquella armonía que permite que el fenómeno fantástico de la vida exista, así como participar en la construcción de nuevos caminos que aseguren que ese equilibrio se conserve y se difunda llegando hasta los rincones mas contaminados de este nuestro planeta.

Este trabajo no pretende tanto, pero si espero que contribuya al entendimiento del desarrollo de los organismos fotosintéticos que tanta importancia tienen para nuestra y otras muchas especies que nos acompañan en el tiempo que nos tocó vivir.

Cuando apareció la vida sobre la tierra no había oxígeno molecular en la atmósfera, los primeros organismos conocidos como cianobacterias comenzaron a producirlo mediante la fotosíntesis. Durante millones de años moléculas como el ácido sulfhídrico, amoníaco, monóxido de carbono e hidrógeno volcánico se encontraban en la atmósfera y reaccionaban rápidamente con el oxígeno que producían los fotosintetizadores. La disminución de la actividad volcánica permitió que el oxígeno desprendido mediante la fotosíntesis comenzara a acumularse. Para los primeros seres vivos el oxígeno era tóxico así que se adaptaron a su presencia utilizándolo en la respiración, de este modo surgieron los primeros heterótrofos.

En la actualidad los seres vivos utilizan como fuente sustancial de energía bioquímica a la que se encuentra almacenada en los carbohidratos. Cuando estas moléculas son degradadas por

organismos aeróbicos finalmente hay un desprendimiento de dióxido de carbono a la atmósfera así como un consumo de oxígeno. Las fuentes naturales de reincorporación del dióxido de carbono a la atmósfera terrestre son la respiración de plantas, animales y microorganismos, así como la actividad volcánica; aunque existen otras creadas por el hombre como industrias y automóviles.

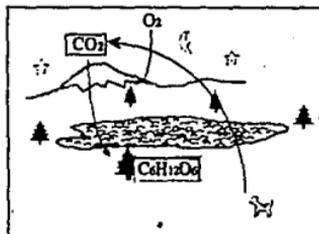


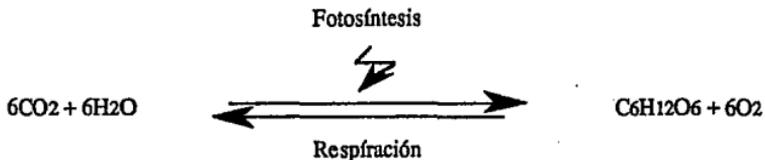
Figura 1. ciclo del carbono

Los océanos son un gran tampón debido a que contienen una cantidad considerable de carbonatos tanto precipitados como disueltos, lo que evita los cambios drásticos en la concentración de dióxido de carbono en la atmósfera (Salisbury and Ross, 1985). Debido principalmente a la combustión del petróleo, aunque también en gran medida por la deforestación, la proporción de dióxido de carbono en la atmósfera terrestre ha aumentado lentamente desde el año de 1850 hasta 1982 de 280 a 340 microlitros/litro (Salisbury and Ross, 1985). Si desapareciera el proceso inverso al descrito, pasado cierto tiempo los carbohidratos se terminarían y no podrían continuar los procesos vitales. El mecanismo mediante el cual se realiza la regeneración del oxígeno molecular y la fijación de CO_2 para producir carbohidratos, es conocido como fotosíntesis y se efectúa tanto en las plantas y algas como en algunos microorganismos, que captan la energía luminosa del sol y la transforman en energía química que se almacena en carbohidratos. Estos organismos, llamados fotosintéticos se encuentran distribuidos en toda la biósfera desde los mares y lagos donde se encuentra la tercera parte de la cantidad de carbono fijado fotosintéticamente, hasta la tierra con las otras dos terceras

partes.

En organismos fotosintéticos terrestres, la eficiencia de la fotosíntesis depende de varios factores como la cantidad de agua en el medio, la concentración de dióxido de carbono, los contaminantes ambientales, los nutrientes, la intensidad y calidad de la luz, la temperatura y la acumulación de polisacáridos. Por otro lado en los mares el factor limitante para la eficacia de este proceso es la concentración de nutrientes minerales (Salisbury and Ross, 1985). La fotosíntesis también está sujeta a regulación por hormonas vegetales, por ejemplo a inhibición por ácido abscísico o bien a inducción por ácido indolacético, citoquininas y giberelinas (Functes and Levine, 1985).

En forma simplificada el proceso bioquímico conocido como fotosíntesis se representa como:



Como podemos ver, en esta reacción se oxida agua u otro donador de electrones como H_2S y se reduce dióxido de carbono a carbohidratos, utilizando energía luminosa. Así, por medio de esta ruta se incorporan a la biósfera nuevos esqueletos de carbono.

En plantas superiores la fotosíntesis se realiza principalmente en las hojas y se da en dos etapas, una llamada fase luminosa, en la cual se genera energía química en forma de adenosín trifosfato (ATP) y poder reductor en forma de nicotinamida adenin dinucleótido (NADPH) reducido y la otra fase llamada oscura, donde se utilizan el ATP y el NADPH generados en la fase luminosa para convertir el CO_2 atmosférico en carbohidratos (Matheus, 1991).

Las plantas asimilan carbono por una de tres rutas fotosintéticas denominadas fotosíntesis tipo C_3 , C_4 y metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM). El metabolismo fotosintético tipo C_3 es el mas

extendido en la naturaleza y consiste en la fijación de CO_2 a una molécula de ribulosa 1-5 bifosfato, produciéndose posteriormente dos moléculas de fosfoglicerato; en los vegetales con ese tipo de fotosíntesis, las reacciones de la fase luminosa y de la fase oscura se dan dentro de las células del mesófilo.

La fotosíntesis tipo C_4 se realiza dentro de dos tipos celulares diferentes, es mas efectiva a bajas concentraciones de CO_2 y temperaturas elevadas (Ehlernger, etal, 1991) y representa a una modificación en el metabolismo C_3 . Se sabe que el metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM) se realiza entre algunas especies de Agavaceae, Aizoaceae, Cactaceae, Compositae, Crassulaceae, Cucurbitaceae, etc., que se encuentran expuestas a condiciones de altas temperaturas e iluminación durante el día. En las plantas con CAM durante la noche se fija CO_2 en málico y durante el día este se transfiere a la ribulosa 1-5 bifosfato. Ambos procesos se realizan en las células del mesófilo.

El crecimiento y desarrollo de las plantas depende de la interacción de muchos factores ambientales. La percepción de la luz por las plantas se realiza gracias a la sensibilidad de una serie de receptores luminosos conocidos como cromóforos, que absorben radiación electromagnética del infrarrojo cercano y visible. Entre los receptores mas importantes se encuentran el fitocromo, la protoclorofila y el receptor de luz azul. Los organismos fotosintéticos poseen clorofilas, carotenos y ficobilinas, pigmentos que captan y utilizan la luz solar para excitar electrones y provocar la formación de una cadena de transporte electrónico. Las algas y hongos no tienen fitocromo pero contienen un pigmento llamado criptocromo que capta la luz azul. La reducción de protoclorofila, precursor de la clorofila, es dependiente de luz. El fitocromo es una cromoproteína cuyo cromóforo es un tetrapirrol que puede estar en una de dos estructuras fotoconvertibles: Pr con un máximo de absorción a 666 nm y Pfr que tiene su máximo en 730 nm. Del receptor de luz azul se sabe muy poco. En plantas superiores los pigmentos más abundantes son la clorofila a y b así como las porfirinas con un ión magnesio coordinado. Estos cromóforos junto con pigmentos accesorios se encuentran en membranas con composición poco común ya que contienen solo una pequeña

fracción de los fosfolípidos usuales, pero son ricas en glicolípidos, también tienen proteínas y unidos a algunas de ellas los pigmentos.

La luz no sólo es la fuerza que dirige la fotosíntesis sino que cataliza la producción de clorofila y regula la expresión de genes nucleares y cloroplásticos (Gruissem, 1989). También funciona como modulador de respuestas morfológicas entre las que se encuentran inhibición de la germinación de muchas semillas, arreglo de los cloroplastos dentro de la célula para protegerse de la luz directa del sol, aumento de la producción de pigmentos como antocianinas y otros flavonoides, fotoperíodo y desarrollo de los plástidos (Anderson, 1986), (Salisbury, 1985). Las plantas son capaces de adaptarse a un ambiente luminoso particular con determinada intensidad, calidad y duración, modulando la composición de las membranas tilacoideas en una manera coordinada e integrada, para sacar el mayor provecho de los cuantos de luz. Cuando crece una planta en la oscuridad los hipocotilos se elongan y los cloroplastos no se desarrollan normalmente. En estas condiciones hay una expresión muy baja de los genes regulados por luz, como por ejemplo, los genes nucleares que codifican para las proteínas que unen clorofila en el complejo de captación de luz (CAB) y la subunidad pequeña de la RuBP carboxilasa encargada de fijar CO_2 . En cambio, con la luz se inhibe la elongación de los hipocotilos e induce expansión de la hoja y la diferenciación del cloroplasto. Los genes regulados por luz se expresan 100 veces más que los genes de plantas etioladas y su expresión se encuentra restringida a ciertas regiones de la planta (Chory, 1993). Así, los patrones de expresión de esos genes dependen de la luz y de factores célula-específicos.

II TIPOS DE PLASTIDOS

Además de las mitocondrias, organelos donde se realiza la respiración celular de eucariotes, existen diferentes organelos en plantas superiores y algas conocidos como plástidos. Estos organelos se replican autónomamente, tienen DNA propio y están rodeados por una envoltura estructurada por dos membranas, tienen diferentes formas y adquieren diversas funciones

dependiendo del tipo de célula vegetal en la cual se encuentren. De ellos los más estudiados son los cloroplastos, donde se realiza la fotosíntesis y que se localizan principalmente en la hoja dentro de las células del mesófilo. Su número varía en diferentes células, tejidos, estado de desarrollo y también entre especies (Anderson and Beardall, 1991). Por otro lado la fotosíntesis en bacterias se realiza en invaginaciones de la membrana plasmática.

La diferenciación de los plástidos está asociada con cambios morfogénéticos y moleculares significativos en plantas. Los cloroplastos fotosintéticamente activos se desarrollan a partir de proplástidos mediante la proliferación de las membranas internas, la acumulación de clorofila y el ensamblaje del complejo sistema tilacoideo.

Otras formas de plástidos son los cromoplastos. Estos organelos contienen carotenoides que los colorean de amarillo, naranja o rojo y funcionan en gran medida como atractores de polinizadores y animales en flores y frutas (Newcomb, 1990), aunque también están en algunas raíces y hojas viejas (Possingham, 1980). Hay plástidos que almacenan compuestos, por ejemplo los amiloplastos almacenan almidón, mientras que las proteínas se almacenan en elaioplastos.

Los proplástidos son precursores de los diferentes plástidos incoloros o amarillo pálido. Los etioplastos son del mismo color, ya que estos al crecer en la oscuridad no han completado su desarrollo y carecen de pigmentos, pero si se exponen a la luz pueden diferenciarse a cloroplastos (Anderson and Beardall, 1991). Los proplástidos, progenitores de los cloroplastos, son organelos con forma esférica y con muy pocos tilacoides que aparecen durante la formación del cigoto y se mantienen desdiferenciados en las células meristemáticas. Los proplástidos también se pueden formar durante la dormancia estacional, o durante la maduración de estructuras especializadas como el polen y las células huevo (Mullet, 1988). Los diferentes tipos de proplástidos son: eoplastos, amiloplastos, plástidos ameboides y plástidos pregranales, como se ilustra en la figura 2. Durante la germinación algunos proplástidos que se encuentran en la parte aérea de la planta aumentan de tamaño y se desarrollan a etioplastos con cuerpos prolamelares típicos. Después, cuando la parte aérea de la plántula se expone a la luz, en los etioplastos de los cotiledones y hojas primarias existe

proliferación de membranas tilacoideas, con lo que estos etioplastos se desarrollan en cloroplastos (Possingham, 1980).

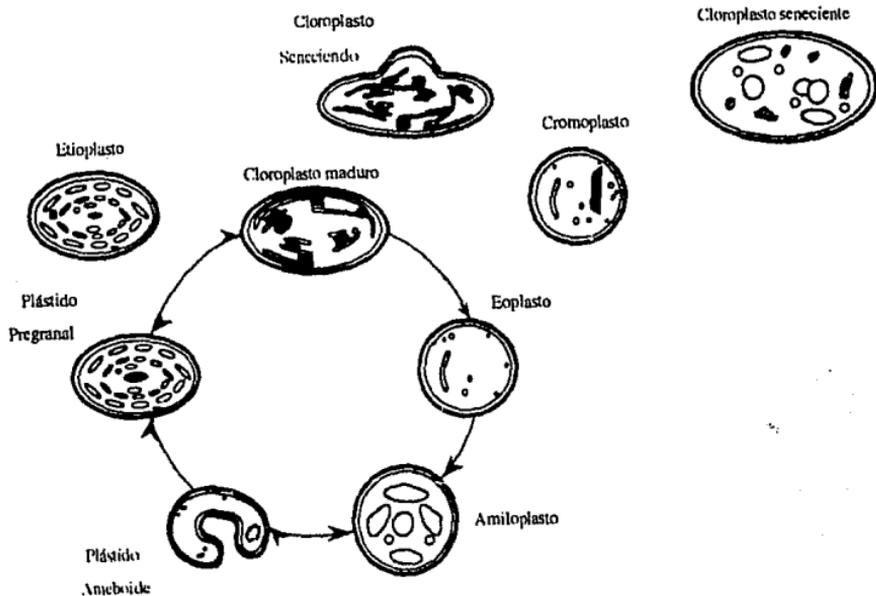


Figura 2. Ciclo de desarrollo de los plástidos (Thomson, 1980).

Los eoplastos son organelos pequeños, de forma aproximadamente esférica que tienen una doble membrana. Contienen pedazos de membrana tilacoidea que parecen formarse por invaginaciones de la envoltura interior del plástido y en ocasiones pequeños gránulos de almidón. Los eoplastos se encuentran comúnmente en los meristemos, pueden producirse durante la dormancia estacional, o durante la maduración de ciertas células especializadas, y repetidamente durante el desarrollo de la planta, como en el huevo en desarrollo, polen, cigoto y semilla madura (Thomson, 1980), (Mullet, 1988). Los amiloplastos no contienen clorofila y tienen gránulos de almidón. Se encuentran en diferentes tipos de células, como en tejidos de almacenamiento o la cubierta de las

raíces asociada con geotropismo, así como en meristemos. Son esféricos y pueden tener almidón en forma de un gránulo grande o varios pequeños. Cuando el coplasto se transforma en amiloplasto puede darse una asociación transitoria entre el plástido y el retículo endoplásmico que cambia de liso a rugoso.

III.- ESTRUCTURA DEL CLOROPLASTO

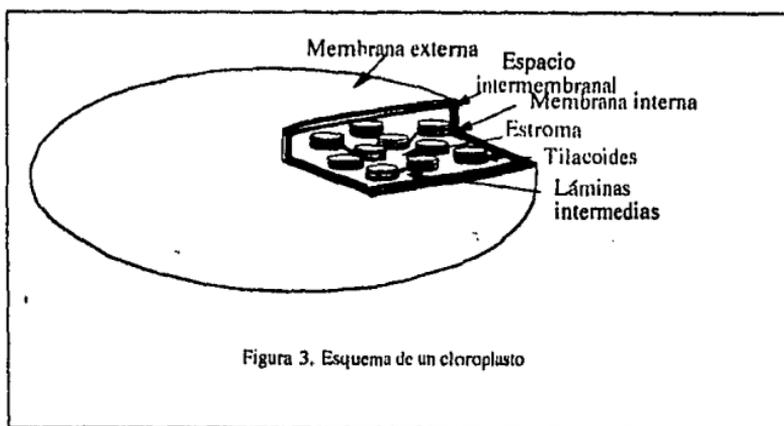


Figura 3. Esquema de un cloroplasto

Como se esquematiza en la fig. 3, los cloroplastos tienen una membrana externa completamente permeable y una interna selectivamente permeable (Stryer, 1988).

La membrana interna encierra un material análogo al de la matriz mitocondrial llamado el estroma e inmersas en el estroma hay muchas estructuras membranales que son prolongación de la membrana interna con forma de saco conocidas como tilacoides que a menudo se encuentran apiladas como monedas formando unidades denominadas grana. Los grana están interconectados irregularmente por extensiones nombradas lamelas del estroma (Stryer, 1988). Finalmente la membrana tilacoidea encierra un espacio interior, el lúmen (Matheus, 1991).

Las plantas poseen tres genomas independientes: el nuclear, el mitocondrial y el plástido; este

último es el que ha conservado evolutivamente en mayor grado su estructura general y su tamaño. Los cloroplastos son organelos que se replican autónomamente y cuyas proteínas o subunidades proteicas están codificadas tanto en el núcleo como en el genoma del cloroplasto. En el genoma del plástido hay genes que codifican para proteínas involucradas en la fotosíntesis, la transcripción, traducción y replicación de la información genética del plástido. La expresión de los genes plastídicos está regulada en parte a nivel transcripcional, pero también juegan un papel importante en la estabilidad del mensajero durante su desarrollo, la actividad traduccional y la fosforilación de proteínas (Gruissem and Tonkyn, 1993). Los genomas plastídicos son circulares y en plantas vasculares normalmente tienen un tamaño que va de 120 a 180 Kb. Estas moléculas se encuentran en el estroma, asociadas a la membrana interna del cloroplasto o a la membrana tilacoidea en agregados de 10 a 20 moléculas.

Por último se encuentran genes que codifican para el complejo de NADH oxidoreductasa y 19 marcos de lectura abiertos (con más de 100 codones) con función aún desconocida. Como ya se mencionó, el genoma del cloroplasto contribuye solo con una parte de los polipéptidos del plástido. Por ejemplo, el genoma plastídico codifica para 19 de las 52 proteínas encontradas en ribosomas del cloroplasto y una de las dos subunidades de la RuBP carboxilasa (Mullet, 1988).

La proliferación membranal que se realiza durante el desarrollo del cloroplasto necesita de la síntesis de lípidos y durante este proceso va cambiando la composición lipídica de la membrana aumentando el grado de insaturaciones y aparece un lípido nuevo, el fosfatidil glicerol (Hugly and Summerville, 1991), (Anderson and Beardall, 1991). La composición de la membrana interna del plástido varía también en respuesta a condiciones ambientales o bien para que la planta tome ciertas formas especializadas como en la formación de un cloroplasto maduro a partir de un plástido pregranal o de un etioplasto (Mullet, 1988). Además de la composición lipídica, también cambia el tamaño durante el desarrollo del cloroplasto. Existe un incremento en volumen del plástido que puede ser mayor a 100 veces. Parte de este aumento se da por acumulación de proteínas, lípidos y cofactores requeridos para la fotosíntesis (Mullet, 1988). Esta síntesis coordinada y el ensamblaje

de los complejos protéicos cloroplásticos se realiza en mayor parte por la activación de la transcripción genética tanto de genes nucleares como del cloroplasto, por señales celulares o ambientales, aunque la acumulación de proteínas de cloroplasto también está regulada a nivel de traducción (Mullet, 1988).

Al igual que las mitocondrias, los cloroplastos importan una gran variedad de proteínas que se sintetizan fuera de él (Ellis, 1981); estas proteínas son procesadas durante o inmediatamente después de su transporte a través de la membrana del cloroplasto. El fragmento de la proteína que va a ser procesada proteolíticamente y es necesaria para el importe de la misma se llama péptido de tránsito y puede variar su longitud de 29 (un precursor de la proteína que une clorofila a-b (CAB)) a 100 aminoácidos (acetolactato sintasa). Los péptidos tránsito de diferentes proteínas cloroplásticas codificadas en el núcleo no tienen homología significativa a nivel de estructura primaria, sin embargo comparten ciertas características: son ricos en serina y treonina (20-35%) y son ricos en aminoácidos hidrofóbicos como alanina y valina. Los péptidos tránsito generalmente tienen una carga neta positiva, no son especialmente ricos en aminoácidos básicos y son deficientes en aminoácidos ácidos, de los cuales normalmente solo tienen uno o dos.

Cuando la función de proteínas codificadas en núcleo se localiza hasta el lumen del tilacoide son necesarios dos pasos de maduración y cuando su destino se encuentra en el estroma, requieren. Durante el transporte el precursor de la proteína se asocia con la superficie del cloroplasto utilizando ATP quizá por la interacción con lípidos de la membrana externa y se transloca a través de las dos membranas (Theg and Varian, 1993). Una vez dentro del cloroplasto, estas proteínas se pueden ensamblar con otras sintetizadas en el cloroplasto o en citosol para formar complejos protéicos como el caso del fotosistema II en que ocho proteínas se sintetizan en núcleo y posteriormente se importan a cloroplasto donde se ensamblan con por lo menos otras ocho codificadas en este organelo.

Los lípidos forman del 25-30% de la masa de las membranas tilacoideas y actúan como una matriz fluida para los complejos funcionales supramoleculares que permite la difusión. Una característica

importante de la composición de la membrana tilacoidea es que mas del 50% del total de los lípidos lo compone el monogalactocildiacilglicerol, lípido que no forma estructura de bicapa en dispersión acuosa, sino que forma micelas invertidas cilíndricas. Embebidos en esta matriz se encuentran los complejos proteicos necesarios para la realización de la fotosíntesis. En la figura 4 se ilustra mediante un esquema la organización de las proteínas en la membrana de los tilacoides (Hageman , Baecke, etal, 1990).

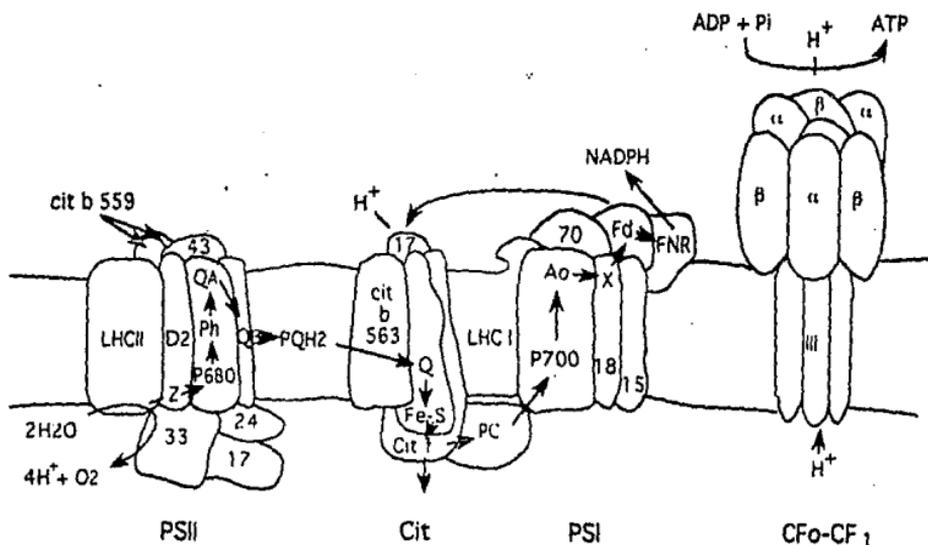


Figura 4. Esquema de la organización de los complejos proteicos en la membrana tilacoidea.

IV.- LA FOTOSINTESIS

1) Definición y reacción.

Aproximadamente hace tres billones de años algunas células fotosintéticas lograron sobrevivir en casi cualquier ambiente con ayuda de la energía luminosa atrapando los electrones y protones del agua (Govindjee and Coleman, 1990). En nuestra era, la fotosíntesis es el proceso metabólico mediante el cual llega a la biósfera la energía libre y el carbono requeridos para los procesos vitales. La reacción general de la fotosíntesis se puede escribir:



donde H_2A es un reductor general y A es su producto oxidado.

La fotosíntesis está física y químicamente separada en dos subprocesos. El primero es la fase luminosa, donde se utiliza la energía de la luz solar para oxidar el agua y el segundo es la fase oscura en la que se realiza la fijación del carbono.

2) Fase luminosa:

En la fase luminosa el agente reductor NADP^+ se reduce a NADPH , produciendo equivalentes reductores y desprendiendo 2A , siendo A en la mayoría de los casos oxígeno (Matheus, 1991), aunque también puede ser azufre u otro aceptor de electrones. Parte de esta energía es capturada por el ADP formándose ATP. El segundo es la fase oscura donde se utilizan NADPH y ATP en la síntesis reductiva de carbohidratos a partir de CO_2 y H_2O .

Los pigmentos captadores de luz asociados a proteínas y ensamblados en la membrana tilacoidea

están organizados en dos fotosistemas bien definidos que se denominan I y II. Estos representan unidades estructurales dedicadas a la tarea de absorber un fotón y rescatar parte de su energía en una forma química. En los fotosistemas se da el fenómeno de transferencia resonante, de manera que cuando se excitan los electrones en moléculas muy cercanas la energía de excitación puede pasar de una molécula a la adyacente, o bien la transferencia de electrones, en la que el electrón excitado puede transferirse de un compuesto a otro con un estado de excitación un poco menor.

Todas las reacciones luminosas se realizan en o entre las membranas tilacoideas. El ATP y el NADPH son enviados al estroma donde se dan las reacciones oscuras. La mayor parte de las proteínas tilacoideas están organizadas en cinco complejos que pueden tener otras proteínas asociadas. Este conjunto de proteínas se encarga de la captación de luz, transporte electrónico, translocación protónica y funciones de síntesis de ATP de los tilacoides.

En los tilacoides el complejo de captación de energía es el componente principal y cuenta con más de la mitad de la clorofila total así como gran parte de las proteínas intrínsecas. La mayor parte de las clorofilas, así como los pigmentos accesorios actúan como moléculas antena absorbiendo fotones y transfiriendo energía a los centros de reacción, donde hay una clorofila rodeada por un ambiente químico diferente al resto que le permite tener un nivel de energía menor en el estado excitado. El complejo de captación de energía luminosa del fotosistema I absorbe luz arriba de 700nm y se conoce como P700 mientras que el de el fotosistema II absorbe a longitudes de onda menores de 680nm y se le llama P680. En ambos fotosistemas el paso primario es la transferencia de un electrón excitado por luz de un centro de reacción P680 o P700 a una cadena de transporte electrónico.

La fuente de electrones es el agua y su destino final es la reducción del NADP⁺. Los protones que se producen son bombeados a través de la membrana del tilacoide, produciéndose un gradiente que impulsa la formación de ATP (Matheus, 1991).

Las reacciones luminosas se ilustran en la figura 5.

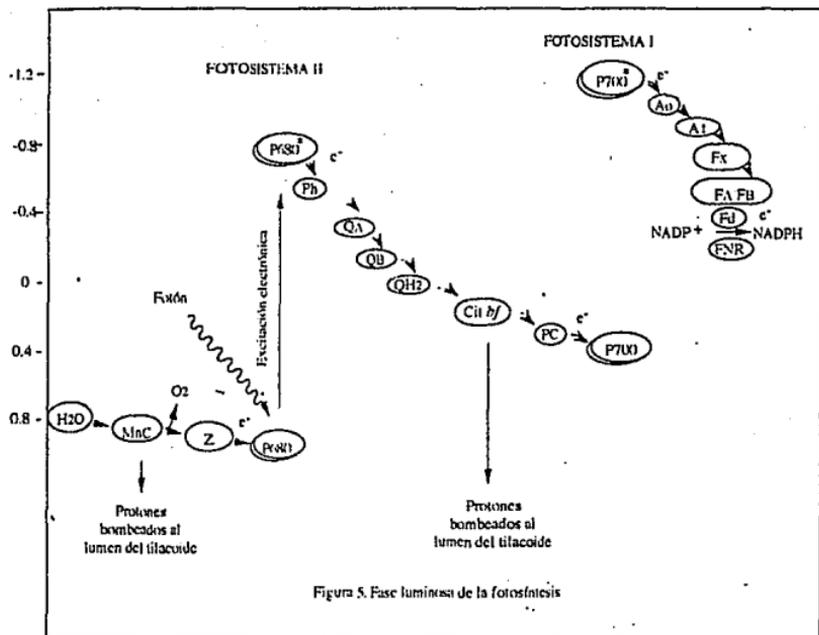


Figura 5. Fase luminosa de la fotosíntesis

En esta sección voy a describir con mas detalle la composición del aparato fotosintético y el modo en el que se lleva a cabo el mismo proceso.

2.1) Fotosistema II vegetal:

El fotosistema II como se ve en la figura 6 está constituido por un conjunto transmembranal organizado de varias cadenas polipeptídicas, que forman un complejo captador de luz, un núcleo con el centro de reacción P680 y un complejo productor de oxígeno (Stryer, 1988).

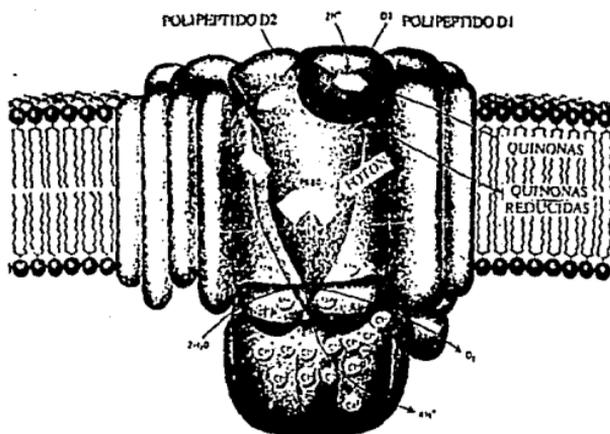


Figura 6

Fotosistema II: es el complejo de proteínas y pigmentos que produce oxígeno y atrapa la energía luminosa, en la membrana tilacoidea de los cloroplastos. El flujo de electrones a través del fotosistema se da con la absorción de un fotón por un par de clorofilas especiales (P680). El proceso involucra a muchas otras moléculas incluyendo la feofitina (Feo) y dos clases de quinonas (Q_A y Q_B) y aquellos átomos metálicos e iones como manganeso (Mn), cloruro (Cl^-) y calcio (Ca^{2+}). En este modelo simplificado algunos pigmentos se omitieron para obtener claridad. Las reacciones del fotosistema II junto al lado interno de la membrana toma cuatro electrones de dos moléculas de agua y produce oxígeno molecular; esas reacciones constituyen el reloj de oxidación de agua. Los protones que se desprenden de esas reacciones contribuyen a la síntesis de adenosín trifosfato (Govindjee y Coleman, 1990).

El centro de reacción P680 es un excelente agente reductor cuando tiene un electrón excitado y lo dona fácilmente a una molécula de menor energía, la feofitina, que a su vez lo transfiere a una serie de plastoquinonas (Q_A y Q_B) asociadas con proteínas. Por último salen dos electrones y dos protones de la plastoquinona Q_B y la molécula reducida se libera a la parte lipídica de la membrana tilacoidea. La plastoquinona reducida (plastoquinol) interacciona con un complejo de

citocromos y proteínas de hierro-azufre (el citocromo *bf*) que catalizan el paso de los electrones a una proteína de cobre (la plastocianina), y se bombean los dos protones hacia el lumen del tilacoide (Matheus, 1991). Este proceso deja a los centros de reacción P680 deficientes en electrones, que son recuperados de una molécula de agua siguiendo una serie de pasos en la que una metaloproteína que contiene manganeso sirve como aceptor de cuatro electrones que pasa al complejo oxidado P680+, a través de un intermediario llamado Z. Durante este proceso se bombean cuatro protones del estroma al lumen del tilacoide y se desprende oxígeno que se difunde hacia fuera del cloroplasto. La plastocianina, que es una proteína móvil en el lumen del tilacoide, dona los electrones a otros centros de reacción que absorben a 700 nm y son parte del fotosistema I, los P700.

2.2) Fotosistema I:

En el fotosistema I la clorofila en el centro de reacción denominado P700 se oxida y el electrón excitado pasa a través de una clorofila aceptora (A_0), a una filoquinona (A_1) y mas tarde se translada a una serie de tres proteínas hierro-azufradas (F_X , F_A y F_B), por último este electrón se transfiere a una ferredoxina soluble (Fd), que se encuentra en el estroma. Al reducirse la ferredoxina, transfiere los electrones al NADP+ con la acción de la enzima ferredoxin:NADP+ reductasa.

Durante el proceso global se genera un gradiente de protones a través de la membrana del tilacoide, volviéndose más ácido el lumen que el estroma. Este gradiente puede ser hasta de 3.5 unidades de pH en cloroplastos iluminados. Los protones pueden regresar al estroma únicamente atravesando complejos que forman a la ATP sintasa, los cuales en cloroplasto se llaman CF_1 - CF_0 . De este modo se genera un ATP por cada tres protones que atraviezan el complejo. Como se transportan dos o tres protones por electrón, se puede generar hasta un ATP por cada electrón que pasa por la cadena.

2.3) Flujo cíclico de electrones:

Existe un mecanismo alternativo a la fase luminosa de la fotosíntesis llamado flujo cíclico que sirve para generar ATP cuando hay suficiente poder reductor disponible en forma de NADPH. Dicho proceso mantiene el equilibrio entre la producción de energía y de poder reductor.

En el flujo cíclico en lugar de que los electrones se transfieran del P700 excitado al NADP⁺, pasan de la ferredoxina al complejo citocromo *bf* y regresan via plastocianina al estado basal del P700. El complejo *bf* bombea protones a través de la membrana del tilacoide asegurando la producción de ATP. En este ciclo no hay desprendimiento de O₂ ni reducción de NADP⁺.

3) Centros de reacción en bacterias fotosintéticas:

Al igual que en plantas superiores, los centros de reacción de las bacterias fotosintéticas son complejos proteína-pigmento cuyos grupos prostéticos se encuentran en forma de dos brazos.

Basándose en el análisis de los componentes de estos centros se ha propuesto un modelo de la estructura donde hay un complejo proteico formado por cuatro polipéptidos.

La parte del complejo que se encuentra en el espacio periplásmico (fuera de la membrana plasmática) es un citocromo con cuatro grupos hemo.

El centro de reacción de bacterias está constituido por tres subunidades denominadas como L (ligera), M (mediana) y H (pesada) en base a su migración electroforética en geles de SDS y poliacrilamida. La subunidad H se encuentra en su mayor parte en la cara citosólica de la membrana. Inmersas en la membrana están las subunidades L y M que tienen cinco α hélices, dos moléculas de bacterioclorofila *b*, dos bacteriofitinas, dos quinonas (Q_A y Q_B) y un átomo de hierro.

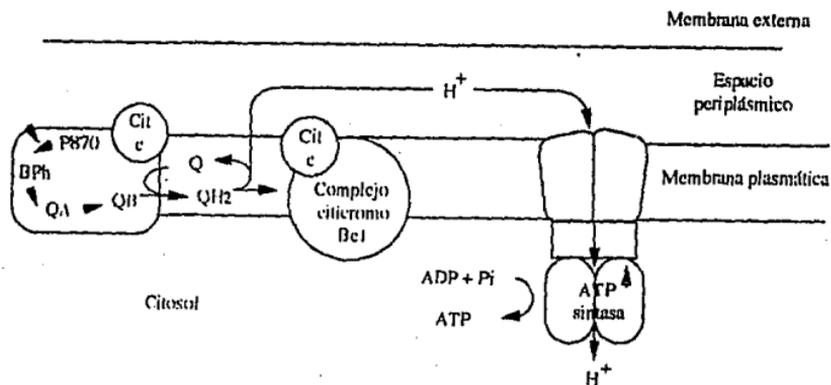


Figura 7. Mecanismo postulado para la fotosíntesis bacteriana (Matheus, 1991).

El centro de reacción de la bacteria *Rhodobacter spheroides* se parece químicamente al fotosistema II de plantas ya que contiene bacteriofitinas y quinonas. Durante la absorción de luz el centro de reacción se excita y un electrón se transfiere de un par de bacterioclorofilas (P) inmediatamente a una feofitina, de aquí a la quinona Q_A a lo largo del brazo A y después a la quinona Q_B como se esquematiza en la figura 7.

4) Fase oscura. Metabolismo de asimilación de carbono.

Durante la reacción oscura de la fotosíntesis se fija el dióxido de carbono atmosférico en carbohidratos, el CO_2 se agrega a una molécula aceptora cada vez que esta pasa por una serie cíclica de reacciones, conocidas como ciclo de Calvin, que se consumen en la formación de carbohidratos y la regeneración de la molécula aceptora. Para que estas reacciones se realicen es necesario que haya ATP y NADPH disponibles, y como ya se mencionó en la fase luminosa, se

producen ambos. El ciclo de Calvin ilustrado en la Figura 8 se da en dos etapas: en la primera el dióxido de carbono es fijado como carboxilato y reducido, dando una síntesis neta de carbohidratos. En la segunda etapa se regenera la molécula aceptora (ribulosa-1,5-bisfosfato). En las plantas denominadas C_3 el dióxido de carbono se difunde al estroma donde se adiciona al carbono carbonílico de la ribulosa 1-5 difosfato (RuBP), reacción catalizada por la RuBP carboxilasa-oxigenasa dando como producto fosfogliceraldehído (3PGA) que es una molécula de tres carbonos que va a ser metabolizada hacia los productos principales de la fotosíntesis.

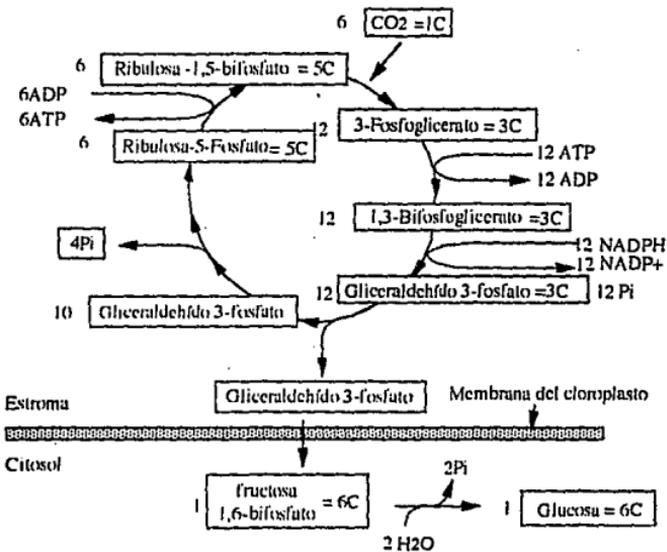
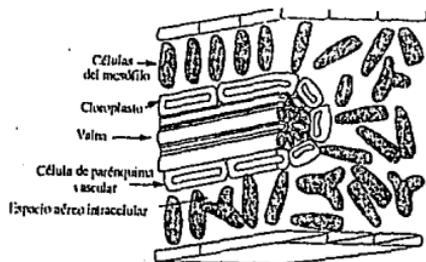
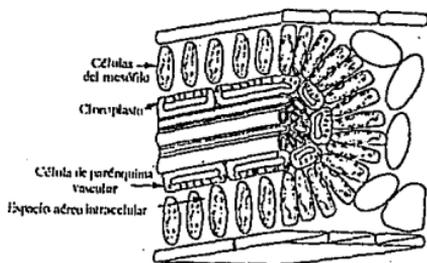


Figura 8. Ciclo de Calvin.

La RuBP carboxilasa oxigenasa también puede catalizar la oxigenación de RuBP para formar un PGA y un fosfoglicolato, que cuando se metaboliza produce CO_2 reduciendo la eficiencia neta de la fotosíntesis, este proceso se conoce como fotorespiración (Ehleringer, et al, 1991). Aunque el O_2

inhibe la fotosíntesis en plantas C_3 debido a la fotorespiración, se puede revertir mediante el aumento de la concentración de CO_2 . Aproximadamente el 50% del CO_2 producido durante la fotorespiración es recapturado por el cloroplasto antes de escapar fuera de la célula, finalmente, la pérdida de carbono es aproximadamente el 30% de la asimilación de CO_2 .

La vía fotosintética denominada C_4 , se encuentra en angiospermas, en monocotiledoneas y en dicotiledoneas, representa una modificación al metabolismo C_3 , más efectivo a bajas concentraciones de CO_2 y altas temperaturas (Ehleringer, et al, 1991).

Hoja C_3 Hoja C_4 Figura 9. Estructura de las hojas C_3 y C_4 .

En plantas que utilizan la vía fotosintética C_4 se evitan las pérdidas debidas a fotorespiración mediante adaptaciones bioquímicas y anatómicas (Rawsthorne, 1992). Las actividades enzimáticas en las plantas C_4 están estrictamente compartimentalizadas mediante una diferenciación morfológica y funcional en dos células fotosintéticas diferentes (parénquima vascular y mesófilo) como se puede ver en la figura 9. En las células del mesófilo, donde no está presente la RuBP carboxilasa/oxigenasa el CO_2 es fijado primeramente en oxalacetato (OAA), molécula de cuatro carbonos mediante la acción de la enzima fosfoenol piruvato carboxilasa (PEP carboxilasa) la cual no tiene función de oxigenasa; entonces el oxalacetato es transformado a uno de los ácidos orgánicos malato o aspartato. El malato o aspartato que se producen en las células del mesófilo se transportan a las células del parénquima vascular donde son descarboxilados. Los cloroplastos del parénquima vascular tienen RuBP carboxilasa oxigenasa (RuBPCasa) y fijan el CO_2 desprendido por descarboxilación de ácidos C_4 utilizando el ciclo de Calvin. El piruvato derivado de la descarboxilación del malato, se transporta ahora a las células del mesófilo donde se fosforila y se carboxila para generar nuevamente el oxalacetato (Hatch, 1992). Fotosintéticamente las plantas C_4 son más eficientes a temperaturas relativamente elevadas, mientras que las C_3 lo son a temperaturas relativamente bajas. Bajas concentraciones de CO_2 favorecen las especies C_4 , mientras que niveles altos favorecen la C_3 . Los cloroplastos de las células del mesófilo se parecen a los de las plantas C_3 . La RuBP utiliza CO_2 , mientras que la PEP carboxilasa fija bicarbonato. La PEP carboxilasa se encuentra en el citosol de las plantas C_4 como la anhidrasa carbónica, mientras que en las C_3 la anhidrasa carbónica se localiza en los cloroplastos y quizá también en el citoplasma.

Una tercera vía fotosintética se conoce como metabolismo ácido de las crasuláceas o también como CAM y es una variante de la vía C_4 que ha evolucionado independientemente en algunas plantas entre las cuales encontramos a las cactáceas y a las crasuláceas. En este caso, también hay

una fijación inicial de CO_2 atmosférico en compuestos de cuatro carbonos y su transferencia final al ciclo de Calvin. Sin embargo en las plantas CAM no hay separación espacial entre la vía C_4 y el ciclo de Calvin; la PEP carboxilasa fija el CO_2 formándose ácido málico en la noche y después, durante el día, el CO_2 fijado se transfiere a la RuBP del ciclo de Calvin en la misma célula. Los compuestos C_4 se almacenan durante la noche en vacuolas que tienen una gran capacidad de almacenar y movilizar ácido málico libre (Stumpf and Conn, 1981). Así se da una separación temporal, de modo distinto a las plantas C_4 donde la separación es espacial. En las plantas CAM se encuentran presentes tanto la RuBP carboxilasa como la PEP carboxilasa, pero la segunda toma una forma inactiva durante el día que es menos afín por PEP y además se inhibe con malato y durante la noche se vuelve tan afín por CO_2 como la RuBP carboxilasa. Las plantas CAM dependen de la acumulación nocturna de compuestos carbonados porque durante el día tienen los estomas cerrados para evitar la pérdida de agua (Raven, Evert and Curtis, 1981).

5) Organización de genes fotosintéticos en bacterias.

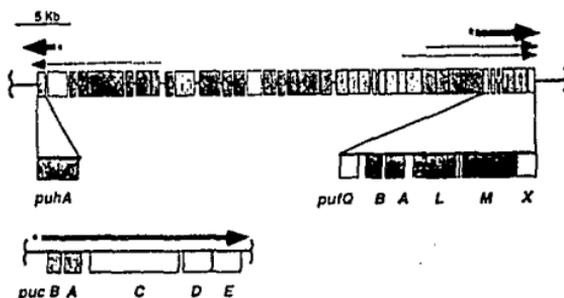


Figura 10. Genes estructurales codificados por los operones *puf*, *puc* y *puh* en *Rhodobacter capsulatus*

(Sganga and Bauer, 1992).

La información genética en bacterias fotosintéticas se encuentra organizada en grupos de genes conocidos como operones, que se transcriben coordinadamente y que están relacionados con la misma vía metabólica o la misma función. A su vez los operones que codifican para proteínas con funciones relacionadas pueden encontrarse en regiones adyacentes. Por ejemplo en *Rhodobacter capsulatus* hay nueve genes para la biosíntesis de carotenos, los cuales se encuentran codificados uno tras otro dentro de una región de 46 kb, que contiene a la mayoría de los genes fotosintéticos flanqueados por *loci* genéticos donde se encuentran genes para la biosíntesis de bacterioclorofila. Junto al grupo de genes anterior se encuentra un operón denominado *puf* compuesto de los genes que codifican para las subunidades L y M del centro de reacción, los componentes α y β del complejo de captación de luz, un gen regulador llamado *puf X* (antes C2814) y un gen encargado de regular los niveles de bacterioclorofila en la célula, conocido como *puf Q* (Bauer, Buggy and Mosley, 1993).

En la figura 10 se muestra el modo en que se encuentran colocados los genes del grupo fotosintético.

En *Rhodospseudomonas viridis* los genes que codifican para las subunidades β y α del complejo de captación de luz B1015 así como las subunidades L, M y citocromo c del centro de reacción fotosintético también están organizadas en un operón *puf* (Wiessner, 1990).

V.-UTILIZACION DE MUTANTES

Para el análisis de los procesos biológicos es muy útil la producción de mutantes que tengan afectada la función de nuestro interés. De este modo se han identificado en diferentes plantas genes tanto reguladores como estructurales que afectan rutas de desarrollo importantes, por ejemplo, el gen *cs* de *Arabidopsis thaliana* que codifica para una proteína de cloroplasto (Koncz, et al, 1990). Se pueden seguir diferentes caminos para obtener mutantes en plantas. Algunos de ellos son

exposición a rayos x, luz ultravioleta o inducción de mutaciones con etil metano sulfonato. Estos métodos producen mutaciones con alta eficiencia pero el aislamiento del gen mutado se vuelve una tarea difícil. Debido a ello se han desarrollado otros métodos para la generación de mutantes, facilitando su aislamiento como son la mutagénesis con T-DNA o con elementos transponibles. La mutagénesis con T-DNA consiste en infectar plantas con *Agrobacterium* que es una bacteria fitopatógena natural. Esta bacteria es capaz de transferir un fragmento de DNA conocido como T-DNA contenido en un plásmido llamado Ti a las células vegetales (de Bruijn and Shell, 1987). Hay una zona del T-DNA que no es indispensable para su introducción al genoma vegetal, por lo cual en dicha región se pueden introducir funciones deseables como una resistencia a determinado antibiótico. El T-DNA puede causar mutaciones al insertarse azarosamente en el genoma vegetal. Después de que obtenemos una mutante con el fenotipo que buscamos podemos encontrar el gen mutado utilizando una sonda que contenga el T-DNA marcado. Por otro lado, para obtención de mutantes en plantas se pueden utilizar también los transposones, que son segmentos de DNA que forman parte del genoma de varios organismos y tienen la capacidad de moverse de un lugar a otro en el genoma. En plantas los que más se han estudiado son los transposones de maíz y de lengua de dragón, aunque hasta el momento no se han aislado transposones activos en muchas plantas, como en *Arabidopsis* y Jitomate. Se ha observado que elementos como el Ac de maíz y el transposón *Tam 3* de lengua de dragón pueden adquirir actividad en otras plantas como tabaco o *Arabidopsis* (Balcells, Swinburne and Coupland, 1991). Una vez obtenida la mutante, también se puede buscar el gen mutado utilizando como sonda el transposón.

Cuando ya se aisló una mutante con el fenotipo buscado el paso que sigue es localizar la mutación y una vez encontrada clonar el fragmento de DNA uniéndolo a vectores plasmídicos o al fago lambda que se pueden replicar dentro de una célula hospedera apropiada (Singer and Berg, 1991).
Clonación y selección de DNA.

Para encontrar un segmento de DNA particular entre todo el DNA que constituye el genoma de una planta podemos romper el genoma en segmentos que se introducen mediante técnicas de DNA

recombinante a vectores plasmídicos o fagos donde quedará integrado el fragmento de nuestro interés. Los vectores de expresión del fago λ fueron diseñados para hacer más fácil el uso de bancos de cDNA.

Los bancos de cDNA que se utilizaron en este trabajo se encontraban en un fago λ modificado que contenía un origen de replicación de plásmido por lo que se le conoce como fásmido con las siguientes características: tiene una selección bioquímica para insertos con adaptadores, además se puede regular la expresión del inserto en *E.coli* o en levadura, tiene la ventaja de ser capaz de existir como lisógenos extracromosomales en *E. coli*, facilitando estudios de complementación y posee un sistema de escisión automático que permite la conversión del fago a un plásmido más pequeño (Elledge Stephen, et al, 1991).

VI ANTECEDENTES

En este trabajo se utilizó una mutante albina de *Arabidopsis thaliana* incapaz de fotosintetizar, que no presenta cloroplastos; en cambio, fenotípicamente sus plástidos son prácticamente incoloros y no desarrollan el sistema tilacoideo como se ve en la figura 11. Esa mutante se obtuvo de un banco de mutantes del Dr. Kent Feldman que habían sido transformadas mediante mutagénesis dirigida con un T-DNA modificado que tiene resistencia a kanamicina y un plásmido pBR. Por análisis de Southern y la segregación del carácter mencionado que fué de tres a uno se concluyó que la mutación fué en un solo gen.

Se realizó el tamizado de una librería genómica de la mutante y una vez localizada la inserción se obtuvo una clona que contenía un fragmento de DNA adyacente al borde izquierdo del T-DNA.

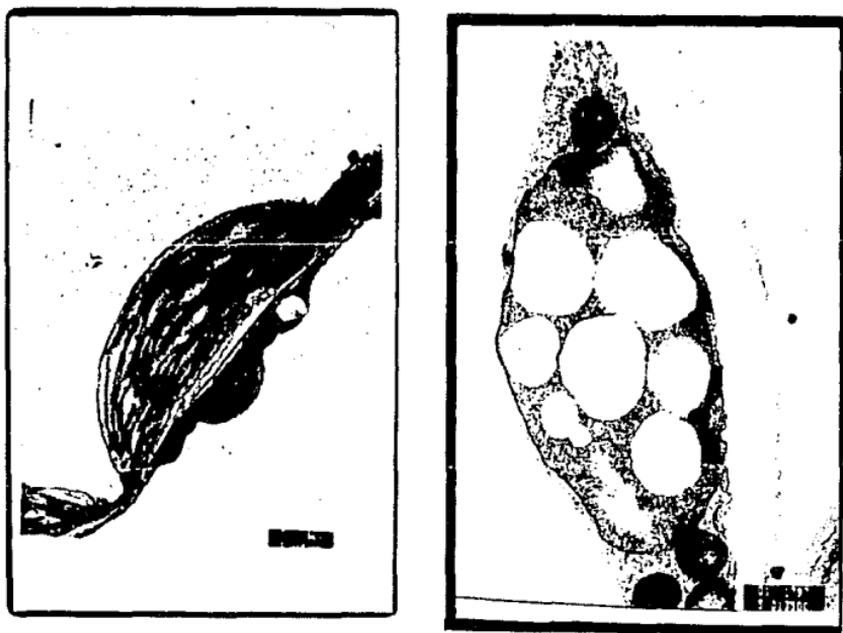


Figura 11. A. Cloroplasto de *Arabidopsis silvestre*. B. "Cloroplasto" de la mutante.

OBJETIVOS

El proyecto tiene como objetivo realizar la caracterización a nivel molecular de el gen que ha sido alterado en la mutante con fenotipo albino obtenida por la Dra. Alejandra Mandel con el fin de lograr un mejor entendimiento del desarrollo del aparato fotosintético. En particular los objetivos de este trabajo son : obtener la secuencia del DNA complementario al RNA mensajero de este gen y analizar la expresión del mismo en diversas plantas.

MATERIALES Y METODOS

I VECTORES Y CEPAS UTILIZADOS

CEPAS	CARACTERISTICAS RELEVANTES	REFERENCIAS
BNN 529	Se utiliza para seleccionar recombinantes en el fago λ .	Maniatis, 1989
CMK	Hipertransformante	Zurita Mario comunicación personal
XL1-BLUE	<i>supE 44 hsdR17 recA1 end A1 gya46 thi</i> <i>relA1 lac^r F' (proAB⁺ lac^rlacZAM15)</i>	Cepa deficiente en recombinación donde se pueden reproducir vectores con algunas mutaciones ambar (AZAP)
PLASMIDOS		
Bluescript	Vector de secuenciación	Stratagene 1991
BACTERIOFAGOS		
λ ZAP	Vector de expresión para aislar genes	Stratagene 1991
λ YES	Vector de expresión para aislar genes eucariotas	Elledge, et al 1991

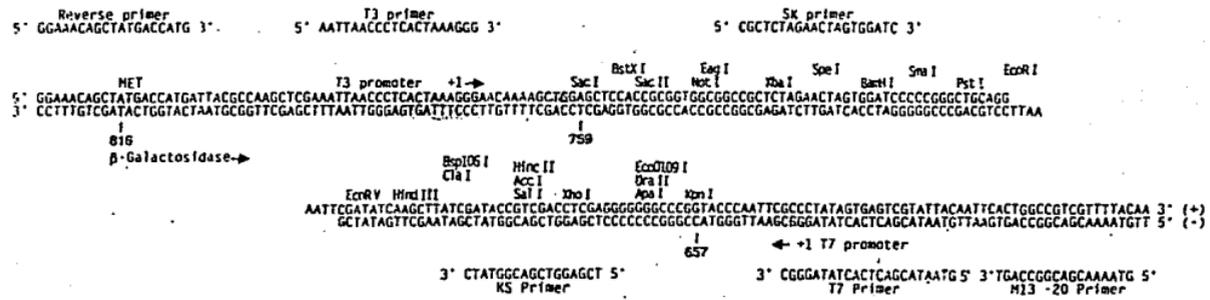
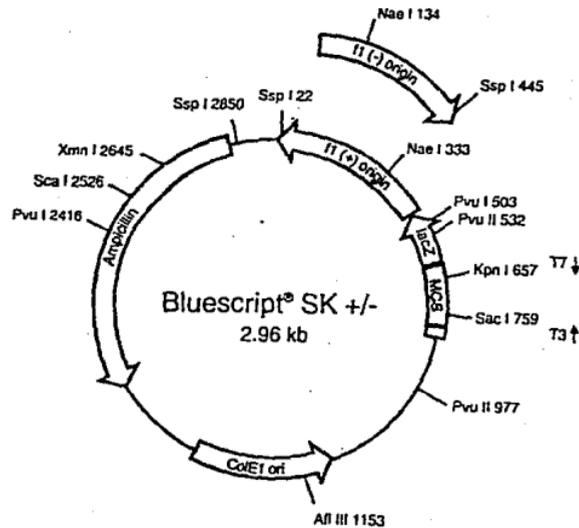


Figura 12. Mapa del pBluescript.

II SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO

1) Soluciones y medios utilizados:

Buffer Tris-Borato (TBE) 5X:

por litro:

Trisma base 54g

Ácido bórico 27,5g

0.5 M EDTA (pH 8.0) 20 ml

TE pH 8.0:

Tris.Cl (pH 8.0) 10mM

NaOH al 0.4%.

Acetato de amonio 7.5M:

por litro:

Acetato de amonio: 578 g.

Acetato de sodio 3M:

por litro:

408.1g de acetato de sodio se disuelven en 800ml de agua, se ajusta el pH a 5.2 y se ajusta el volúmen a un litro.

Sarcosil al 20%.

Bromuro de etidio:

Para poder ver el DNA o el RNA en geles de agarosa se utiliza este colorante fluorescente . Esta sustancia es un mutágeno muy poderoso por lo que se debe manejar con mucho cuidado. Para preparar una solución de 10 mg/ml se agrega 1g de bromuro de etidio a 100 ml de agua y se deja agitando durante varias horas para asegurar que el colorante se disuelva por completo. Se debe guardar

en un recipiente oscuro.

Buffer para muestras de DNA que se van a separar por electroforesis en geles de agarosa:

Azul de bromofenol	0.25%
Xilen cianol	0.25%
Glicerol en agua	30%

T₂₀E₁₀:

Tris 20 mM, EDTA 10 mM (pH 8.0)

Caldo Gonzo (GB):

por litro:

10g de extracto de levadura, 16g de triptona, 1.15 g de KH₂PO₄, 8.5g de K₂HPO₄·3H₂O

SM (este medio se utiliza para almacenar fagos):

por litro:

NaCl 5.8g
MgSO₄·7H₂O 2g
1M Tris.Cl (pH 7.5)
2% gelatina

Caldo Luria:

por litro:

Bacto-triptona 10g
Extracto de levadura 5g
NaCl 10g

MS:

Este medio contiene los macro y micro nutrientes : mio-inositol, tiamina, glicina, ácido nicotínico y piridoxina y se prepara en mg/l con : 1650 de nitrato de amonio, 6.2 de ácido bórico, 332.2 de cloruro de calcio anhidro, 0.025 de cloruro de cobalto hexahidratado, 0.025 de sulfato de cobre pentahidratado, 37.26 de etilendiamino tetracétato disódico, 27.8 de sulfato ferroso heptahidratado, 180.7 de sulfato de magnesio anhidro, 16.9 de Sulfato de manganeso hidratado, 0.25 de la sal de sodio del ácido molíbdico dihidratada, 0.83 de ioduro de potasio, 1900 de nitrato de potasio, 170 de fosfato monobásico de potasio, 8.6 de sulfato de zinc heptahidratado, 2 de glicina, 100 de mio-inositol, 0.5 de ácido nicotínico, 0.5 de piridoxina HCl y 0.1 de tiamina HCl.

Solución nutritiva para *Arabidopsis*:

Para preparar un litro se mezclan las siguientes soluciones previamente preparadas, se afora a un litro y se esteriliza:

KNO ₃ 1M	5ml
KPO ₄ 1M (pH=5.5)	2.5ml
MgSO ₄ 1M	2ml
Ca(NO ₃) ₂	2ml
Fe.EDTA 20mM	2.5ml
Micronutrientes	1ml
Agua	985ml

Micronutrientes: H_3BO_3 70 mM, MnCl_2 14 mM, CuSO_4 0.5mM, ZnSO_4 1mM, NaMoO_4 0.2 mM, NaCl 0.2 mM, CoCl_2 0.01 mM.

Medio de germinación (GM):

1/2 x de mezcla de sales Murashige y Skoog

1% de sacarosa

Ajustar el pH a 5.7 con KOH 1N agregar 1ml/l de de vitaminas B-5 de Gamborg (esterilizar en autoclave) agregar 0.5% de agarosa (para medio sólido).

SSC 20X:

Se disuelven 175.3 g de NaCl y 88.2 g de citrato de sodio en 800 ml de agua. Ajustar a pH 7.0 con una solución de NaOH 10N. Ajustar el volumen a un litro.

Sephadex G-50:

Se va agregando poco a poco medio de Sephadex G-50 a 250 ml de TE (pH 8.0) en un matraz de 500 ml hasta que el polvo está bien disperso. Se deja toda la noche a temperatura ambiente. Se decanta el sobrenadante y reemplaza con un volumen igual de TE (pH 8.0). Se almacena a 4°C.

Buffer de extracción de RNA (Z6):

Clorhidrato de guanidina 8M, MES 20mM, EDTA 20mM y

β -Mercaptoetanol 50mM, ajustar el pH a 7.0.

Buffer II de extracción de RNA (50 ml):

30 g de tiocianato de guanidina, 0.25 g de N-lauril sarcosinato de sodio, 2.5 ml de citrato de sodio 1M, 0.25 ml de b-mercaptoetanol pH 7.0.

MOPS 10X:

MOPS 200mM (pH 7.0), EDTA 10mM y NaAc 50 mM.

Denhardt's 50X:

5 g de ficol, 5g de polivinilpirrolidona, 5g de albúmina bovina, se completa con agua hasta un volúmen de 500 ml. Esta solución se filtra, se separa en alícuotas de 25ml y se almacena a -20°C .

Solución de prehibridación:

Esta solución tiene SSC 6X, SDS 0.5%, solución Denhardt's 5X , 100 mg/ml de esperma de salmón desnaturalizado y 50% de formamida.

Solución de prehibridación con heparina:

12.5 μl heparina	2.5 ml de formamida
250 μl SDS 10%	740 μl agua
1.5 ml SSC 20X	

Acilamida al 40%:

Acilamida al 38% y bis-acilamida al 2%, se disuelven en agua .

II PROTOCOLOS

1) Obtención de tejido vegetal:

Arabidopsis thaliana:

La planta silvestre que se utilizó para todos los experimentos descritos aquí fué de la línea Columbia.

Las semillas se esterilizan sumergiéndolas dos minutos en EtOH al 70%, se enjuagan con H_2O estéril, después se les agrega solución comercial de hipoclorito de sodio (Cloralex) al 25% y se agitan durante ocho minutos, se enjuagan con agua estéril 6 veces.

Las semillas se plantan en vasos de polietileno con una mezcla 1:1:1 de vermiculita, agrolita, Nutriplant, tapadas con una cubierta transparente durante siete días, se riegan con solución

nutritiva en el momento de plantarse y posteriormente una vez a la semana. Se crecen durante 30 días en una cámara a 25°C con fotoperíodo de 16 horas de luz y ocho de oscuridad.

Brassica colaraceae: (coliflor): Se siembran y se dejan crecer durante cuatro meses.

Brassica colaraceae (col): Se esterilizan las semillas con cloralex al 15% durante cinco minutos y se enjuagan con agua estéril. Se siembran seis semillas en dos macetas y crecen las plantas durante cuarenta días. Para la obtención de raíz se crecen plantas en bolsas con un papel soporte y se riegan con agua estéril. Se cosechan cinco lotes de diferentes edades: seis, 12, 18, 24 y 60 días.

Zea mais: Se dejan las semillas hidratando durante una noche con agua después de esterilizarse con hipoclorito y se siembran en una charola con vermiculita regándolas con agua; se dejan crecer durante 15 días.

Nicotiana tabacum:: En condiciones de esterilidad se ponen a crecer hojas jóvenes con yemas axiales tomadas de un tabaco adulto en MS, durante un mes.

Phaseolus vulgaris: Se siembran cinco semillas de frijol en una maceta con vermiculita estéril, se riegan con agua esterilizada. Se cosechan las hojas mas jóvenes 15 días después de sembradas.

Arachis Hypogea: Se siembran del mismo modo que el frijol pero se cosechan a los dos meses.

2) Extracción de RNA de tejido vegetal.

- Se esteriliza todo el material de vidrio y porcelana que va a ser utilizado en autoclave.
- Se muele el tejido en un mortero, con nitrógeno líquido para evitar la degradación del RNA, se transfiere a un tubo de centrifuga, con por lo menos el triple de capacidad del volumen del tejido, se agrega un volumen de buffer para extracción Z6 ó buffer de extracción (Maniatis 1989), se muele con politrón.
- Se extrae con un volumen de una mezcla 1:1 de fenol:cloroformo, se agita con vortex y se centrifuga durante una hora, a 10000 rpm. Para que las muestras queden mas libres de carbohidratos; se pueden realizar otras dos extracciones con fenol/cloroformo. La fase acuosa se

transfiere a un tubo limpio, y se le agrega 1/20 de volumen de ácido acético 1M y 0.7 volúmenes de etanol.

- La muestra se coloca toda la noche a -20°C para que precipite el RNA. Se centrifuga, durante 15 min a 10000 rpm, el sobrenadante se descarta y la pastilla se resuspende en dos mililitros de agua.

- El RNA se precipita con LiCl en una concentración final 2N, durante toda la noche a 4°C .

- Se centrifuga, el RNA se lava dos veces con etanol al 70% y se resuspende en agua estéril, se mide la concentración en el espectrofotómetro y se observa si no está degradado en un gel de agarosa y buffer MOPS por electroforesis.

3) Purificación de plásmido por gradiente de cloruro de cesio:

- Se inocula caldo GB con $300\mu\text{g/ml}$ de ampicilina con la cepa de *E.coli* y se incuba toda la noche a 37°C .

- El cultivo se centrifuga a $7500 \times g$ durante cinco minutos, y el precipitado se resuspende en 10ml de buffer $\text{T}_{20}\text{E}_{10}$ (Tris 20mM, EDTA 10 mM, pH 8). Para lisar las bacterias se agregan dos volúmenes de una solución recién preparada de NaOH 0.2M y SDS al 1% mezclando con un agitador de vidrio; se incuba a temperatura ambiente durante cinco minutos.

Se agrega 1/2 volumen de acetato de amonio 7.5M y se mezcla vigorosamente. Se coloca en hielo durante 30 min. Se centrifuga 15 minutos a 4°C y 10000 X g y se recupera el sobrenadante.

- Se precipitan los ácidos nucleicos con isopropanol y se coloca el tubo a 4°C por lo menos durante dos horas, se centrifugan a 10000 rpm durante 15 min, el sobrenadante se decanta y la pastilla se resuspende en agua estéril.

- Los ácidos nucleicos se precipitan con 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M y dos y medio volúmenes de etanol, se centrifugan y se decanta el sobrenadante.

- El precipitado se disuelve en una solución de cloruro de cesio con una concentración de 1g/ml, se agrega 0.7 mg/ml de bromuro de etidio y 1/100 de volumen de una solución de sarcosil

al 20%.

- Se centrifuga durante 15 minutos a 7000 RPM y se transfiere el sobrenadante a tubos de ultracentrífuga, se centrifuga a 50K durante 16 horas a 15°C. Se extrae la banda correspondiente al plásmido superenrollado con una jeringa y el bromuro de etidio es removido con isopropanol saturado con NaCl hasta que deje de haber color en las dos fases.

- Se transfiere la fase acuosa a un tubo Corex de 30 ml y se precipita con dos volúmenes de agua y dos volúmenes de etanol absoluto. Se coloca a 4°C durante por lo menos dos horas, se centrifuga, descarta el sobrenadante y resuspende la pastilla en 2 ml de agua, y se precipita con acetato de sodio y etanol varias veces. Se lava la pastilla con etanol al 70%, se decanta y seca con vacío, se disuelve la pastilla en un pequeño volumen de agua, y se transfiere a un tubo apropiado, se cuantifica por espectrometría y se guarda a -20°C.

4) Mapeo con enzimas de restricción:

Las endonucleasas de restricción pueden romper segmentos largos de DNA en fragmentos mas pequeños ya que reconocen con gran afinidad secuencias canónicas de tamaño discreto y cortan en sitios definidos. Estos fragmentos se pueden separar entre si en base a su peso molecular, el método mas común para realizar esto es la electroforesis en un gel semisólido de agarosa o poliacrilamida. Generalmente la movilidad de un fragmento de ADN de doble cadena en un campo eléctrico es inversamente proporcional al logaritmo de su tamaño. Existen fragmentos de ADN de tamaño conocido que se pueden utilizar en un gel como marcadores para saber rápidamente por comparación de que tamaño es un fragmento dado (Singer, and Berg, 1991).

El grupo de fragmentos producidos por una endonucleasa de restricción particular proporciona una huella digital característica de ese DNA. Si se analizan los fragmentos producidos por varias endonucleasas de restricción solas o en combinaciones se puede deducir el orden de los

segmentos dentro de la molécula de DNA original.

5) Transferencia:

La hibridación de una sonda marcada con fragmentos de DNA o RNA embebidos en un gel es muy poco sensible, por ello los fragmentos se deben transferir a un soporte sólido mas adecuado, como una hoja de nitrocelulosa o nylon. El gel se trata con álcali para desnaturalizar el DNA, después de la desnaturalización del DNA la membrana de nylon se pone en contacto con el gel y se pasa una solución buffer a través del gel y la membrana, o bien si se trata de un gel en el cual se separó RNA ponemos directamente la membrana de nylon sobre el gel y se pasa una solución buffer a través de ellos. El DNA o RNA es acarreado y la localización en el plano de los fragmentos no cambia (esto se conoce como transferencia). Una vez transferidos los ácidos nucleicos al filtro soporte, se coloca esta membrana en un horno de vacío a 80°C durante dos horas quedando el DNA/RNA fijado en la membrana.

6) Marcaje de una sonda por Random Primer:

Para que el marcaje por este método sea eficiente se necesita que el DNA se encuentre en forma lineal y de cadena sencilla. Para obtenerlo en forma lineal lo podemos cortar con enzimas de restricción. Entonces tomamos de 25-50 ng en 14.5 µl de DNA y se desnaturaliza colocándolo durante 5 min en agua hirviendo. Enseguida se pone en hielo.

Se agregan 6 µl de buffer 5X de random primer 6 µl de una mezcla de deoxinucleótidos trifosfato que no contiene dCTP y 14.5 µl de la solución del DNA. Se agregan 2.5 µl de dCTP marcado y finalmente 1 µl de Klenow. Se mezcla bien y se centrifuga. Se deja la reacción a temperatura

ambiente durante dos horas.

Para la separación de la sonda marcada de los nucleótidos que no se incorporan se siguió el procedimiento de spin-column en el cual:

Se coloca un pequeño tapón de fibra de vidrio al fondo de una jeringa desechable de 1ml, se prepara en la jeringa una columna de 0.9 ml con Sephadex G-50 equilibrada en TE (pH 8.0), que contenga 0.1M de NaCl.

Se inserta la jeringa en un tubo de centrifuga de 15 ml con un tubo eppendorf abierto en el fondo para recibir las soluciones. Se centrifuga a 1600g por 4 min en una centrifuga de mesa, se agrega sephadex hasta obtener un volumen de 0.9 ml de sephadex empacado.

Se agrega 0.1 ml de STE y vuelve a centrifugar a la misma velocidad durante el mismo tiempo que lo anterior. Esto se realiza dos veces. Se aplica la muestra de DNA a la columna en un volumen total de 0.1 ml (utilizar STE para obtener ese volumen).

Se centrifuga a la misma velocidad y durante el mismo tiempo que antes, colectando el efluente de 100 ml en un tubo eppendorf destapado.

7) Prehibridación:

Los filtros de Nylon con DNA o RNA fijado se colocan en un tubo de hibridación, se les agrega la solución de prehibridación y se colocan por dos horas en un horno de hibridación a 42°C para evitar hibridación inespecífica.

8) Hibridación DNA-DNA:

Después de la reacción de prehibridación se agrega una sonda marcada con ^{32}P bajo condiciones que facilitan la formación de puentes de hidrógeno entre la sonda y el fragmento de DNA complementario, y se puede localizar la hibridación con una autorradiografía en película de rayos x.

Mediante este método se pueden detectar picogramos de un fragmento particular, de la radiactividad específica de la sonda .

9) Hibridación RNA-DNA:

El RNA aislado se separa por peso molecular utilizando electroforesis. Se mezclan 5 µg de RNA con tampón de cargado (Formamida 50%, Formaldehido 10%, MOPS 1X) y desnaturalizados a 65°C durante 5 min. Antes de ser cargadas al gel, a las muestras desnaturalizadas se les agrega 1 µl de solución de bromuro de etidio (10mg/ml) y 4µl de colorante de parado. Las muestras se corren en un gel al 1.2% de agarosa MOPS a 40v durante aproximadamente seis horas. Se transfiere el RNA a una membrana de nylon durante toda la noche utilizando el mismo principio que en el Southern. El buffer de transferencia que se utiliza es SSC 20X. El ARN se fija a la membrana en un horno de vacío a 80°C durante dos horas o bien con UV en un Stratalinker.

10) Aislamiento de clonas de cDNA de bancos de *Arabidopsis thaliana* en lambda.

Titulación de los bancos de cDNA:

- Se inocula la cepa NM-529 de *E.coli* crecida toda la noche en un medio de caldo Luria con 0.2% de maltosa en 50 ml del mismo medio y se incuba a 37°C en agitación hasta que hayan crecido a una densidad óptica de 0.5. a 600nm. Se realizan diluciones seriadas (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ y 10⁻⁶) de los fagos del banco y 100 µl de la dilución del fago , se mezclan con 100 ml de las células e incuban por 15 minutos a 37°C.

- Se agrega agar de superficie (0.7% agar en medio Luria) a 42°C e inocula en cajas con

medio de Luria sólido. Se incuban toda la noche a 43°C y se cuentan las placas que hay en cada caja; relacionando con la dilución a la que corresponden, se obtiene el título del fago.

Tamizado de los bancos de cDNA .

- Se crecen los fagos del mismo modo que en la titulación, inoculando cinco cajas Petri cada una con 2×10^3 fagos para obtener placas de lisis aisladas. Se transfieren por duplicado las placas a una membrana de nylon por contacto directo durante un minuto y se fijan durante 20 minutos con una solución de NaOH al 0.4%. Se lavan con una solución de SSC 2X. Se hibridan con un fragmento genómico (p19-5) marcado con el método de primer extension a temperatura ambiente durante dos horas y se lavan. Se expone ante una película sensible a rayos-x y se revela.

- Se realiza un segundo tamizado tomando las placas que dieron señal de hibridación con la sonda radiactiva. Las placas positivas se sacan con la parte de atrás de una pipeta Pasteur y se colocan en un tubo donde se les agrega SM. Una gota de cada solución de fago se incuba toda la noche a 43°C en medio luria con 2% de maltosa con la cepa NM 529 en el medio de superficie. Se transfieren a una membrana de Hybond N⁺-Plus, siguiendo el procedimiento ya mencionado y se hibridizan.

11) Secuencia:

- Hay una estrategia general para la secuenciación de DNA que consiste en generar dentro de cuatro reacciones por separado un grupo de oligodesoxinucleótidos de cadena sencilla marcados . Los oligonucleótidos que se producen en cada una de las reacciones tienen un extremo fijo y el otro va a terminar secuencialmente cada vez que encuentre una A, una T, una G o una C respectivamente. Los productos de cada reacción se separan por electroforesis en carriles adyacentes de un gel de poliacrilamida de alta resolución. Estos geles contienen una concentración alta de urea (7M) como desnaturizante y de 6-8% de acrilamida .

- Para que el DNA de doble cadena se pueda secuenciar por el método de didesoxi antes se debe desnaturalizar e hibridar con el cebador adecuado. Para que las reacciones de secuencia se realicen se requiere: 1) Una DNA polimerasa que sintetice la cadena complementaria al molde de DNA (Klenow), 2) un oligonucleótido cebador sintético homólogo a un fragmento de una región del DNA cercano a la zona que vamos a secuenciar y que le va a servir a la DNA polimerasa para unirse y comenzar la polimerización, 3) didesoxinucleósidos trifosfato que terminen la elongación de la cadena al azar cuando sean incorporados al final de una cadena creciente, 4) desoxinucleósidos trifosfato marcados con ^{35}S .
- Para secuenciar los fragmentos del gen *L-19* que se encontraban en el plásmido bluescript KS se utilizaron los siguientes cebadores: KS 3' GCTATGGCAGCTGGAGC 5', Reverso 3' GTACCAGTATCGACAA 5', Universal 5' GTAAAACGACGGCCACT 3' y SK 5' TCTAGAAGTGTGGATC 3'.
- La desnaturalización se realiza de la siguiente manera: disolver el plásmido en 7 μl de agua+2 μl de cebador (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$), agregar 1 μl de DMSO e incubar durante 3 minutos a 95°C. Colocar los tubos en nitrógeno líquido durante 5 min., sacar y centrifugar un segundo. Se agregan 2 μl de buffer de secuencia 5x. Se deja 5 min a temperatura ambiente.
- La secuencia se realiza siguiendo el protocolo de secuenciación de United States Biochemical utilizando sequenasa II.
- Se colocan 2,5 μl de cada mezcla de reacción en tubos marcados y se precalientan a 38°C.
- Se diluye la mezcla de marcaje 1:5.
- Se diluye la sequenasa 1:8.
- Al tubo con la mezcla de desnaturalización se le agregan: 1 μl de DTT 0.1M, 2 μl de la dilución de marcaje, 2 μl de la dilución de sequenasa y 0.5ml de (^{35}S). Se mezcla y se incuba a

temperatura ambiente de dos a cinco minutos.

- Se toman 3.5 μ l de la reacción de marcaje y se colocan en cada tubo de terminación. se mezcla y continúa la incubación a 37°C 5min.
- Se detiene la reacción con 4 μ l solución de parado.
- Finalmente se hierven las muestras 2min. inmediatamente antes de cargar.
- Preparación del gel: Los vidrios deben estar completamente limpios ya que el gel debe ser muy delgado y se pueden formar fácilmente burbujas, o bien la muestra puede migrar mas lento o disparejo. En uno de los vidrios se pone sigmacote (sustancia con la cual el gel no se adhiere al vidrio). Para preparar 50 ml de gel se mezclan 23 g de urea, 7.5 ml de solución de acrilamida al 40%, 10 ml de TBE 5X y se completa el volumen con agua.

12) Transformación por el procedimiento del cloruro de calcio:

- Se inoculan 100 ml de caldo luria con 1 ml de un cultivo de bacterias incubado toda la noche . Se crecen las células con agitación hasta que el cultivo tiene una densidad óptica de 0.4-0.5 que son aproximadamente 5×10^7 células por mililitro.
Se coloca en hielo el cultivo durante 10 min. Se centrifuga la suspensión a 4000 g durante 5 min a 4°C.
- Se desecha el sobrenadante y se resuspenden las células en la mitad del volumen original de una solución fría, estéril de CaCl_2 50 mM y tris.Cl pH 8.0. Se coloca durante 15 min la solución en un baño de hielo y se centrifuga a 4000 g durante 5 min.
Se desecha el sobrenadante y se resuspenden las células en 1/15 de volumen original de cultivo en una solución estéril, fría de CaCl_2 50 mM y tris.Cl pH 8.0. Se alicuota en tubos previamente enfriados. Se almacenan las células a 4°C durante 12-24 horas.

- Se agrega el DNA en TE o buffer de ligación. Mezclar y poner en hielo durante 30 min. Se pueden utilizar hasta 40 ng de DNA en 100 μ l de buffer.
 - Se coloca en un baño de agua a 42°C durante 2 min.
 - Se agrega 1 ml de caldo Luria a cada tubo y se incuba a 37°C durante 30 minutos-1 hora sin agitación.
 - Se siembra una cantidad adecuada de células en medio selectivo. La mezcla de transformación se puede sembrar en una sola caja o se puede utilizar el método de agar de superficie. Invertir e incubar a 37°C (Maniatis, Fritsch and Sambrook, 1982).
- Hay distintos marcadores de peso molecular del DNA utilizados en electroforésis, los que se utilizan en este trabajo son los que se pueden ver en la figura 13.

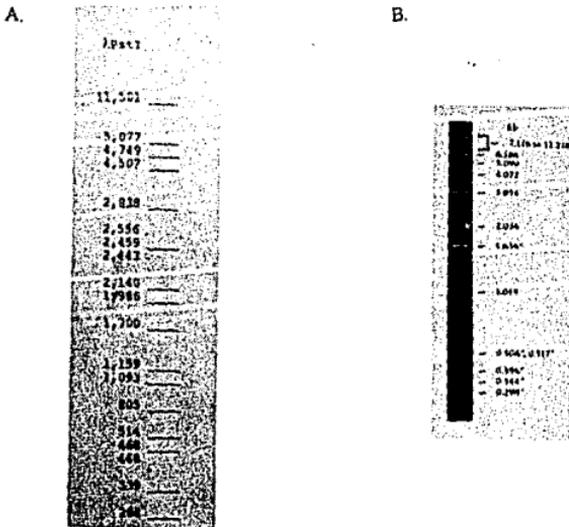


Figura 13. Marcadores de peso molecular para DNA. A. λ Pst. B. DNA Ladder.

RESULTADOS:

I AISLAMIENTO DE CLONAS DE cDNA DE UN BANCO DE *Arabidopsis* EN EL FAGO LAMBDA

Para realizar parte de la caracterización molecular del gen *l-19* de *Arabidopsis thaliana* se utilizaron dos bancos de cDNA construidos en vectores derivados del fago lambda: 1) λ ZAP y el 2) λ YES.

Estos bancos fueron donados por los doctores Plinio Guzmán y Ronald Davis respectivamente.

Para determinar la concentración de fagos en dichos bancos se realizó una titulación.

El título que se obtuvo para los bancos fué:

$$\lambda \text{ ZAP} = 3.2 \times 10^5 \text{ fagos por mililitro.}$$

$$\lambda \text{ YES} = 7.05 \times 10^9 \text{ fagos por mililitro.}$$

Se decidió realizar el tamizado con aproximadamente 10000 placas de cada uno de los bancos utilizando como sonda un fragmento genómico *EcoRI-BamHI* (p19-5) previamente aislado, contiguo al borde izquierdo del T-DNA insertado en la mutante. Las placas que dieron señal positiva en la autorradiografía fueron aisladas y se tamizaron por segunda vez. Al digerir con enzimas de restricción el DNA aislado de las placas que dieron señal positiva en el segundo tamizado y separando este DNA por electroforesis en gel de agarosa, se vió cuales fagos contenían inserto. Para subclonar esos insertos se incubaron los fagos de las placas positivas con la cepa BNN 132 y se seleccionó el plásmido con ampicilina. Se purificó DNA plasmídico de las colonias resistentes a ampicilina. Algunas de las placas que dieron señal positiva en el segundo tamizado se pueden observar en la figura 14.

Entonces, a los plásmidos aislados, se les digirió con *EcoRI* para liberar el fragmento de cDNA del vector. Se separaron los productos de esta reacción de digestión mediante electroforesis, y se realizó un Southern, que se ilustra en la figura 15, utilizando como sonda el mismo fragmento genómico con el cual se tamizaron los bancos contra las clonas que habían dado señal.

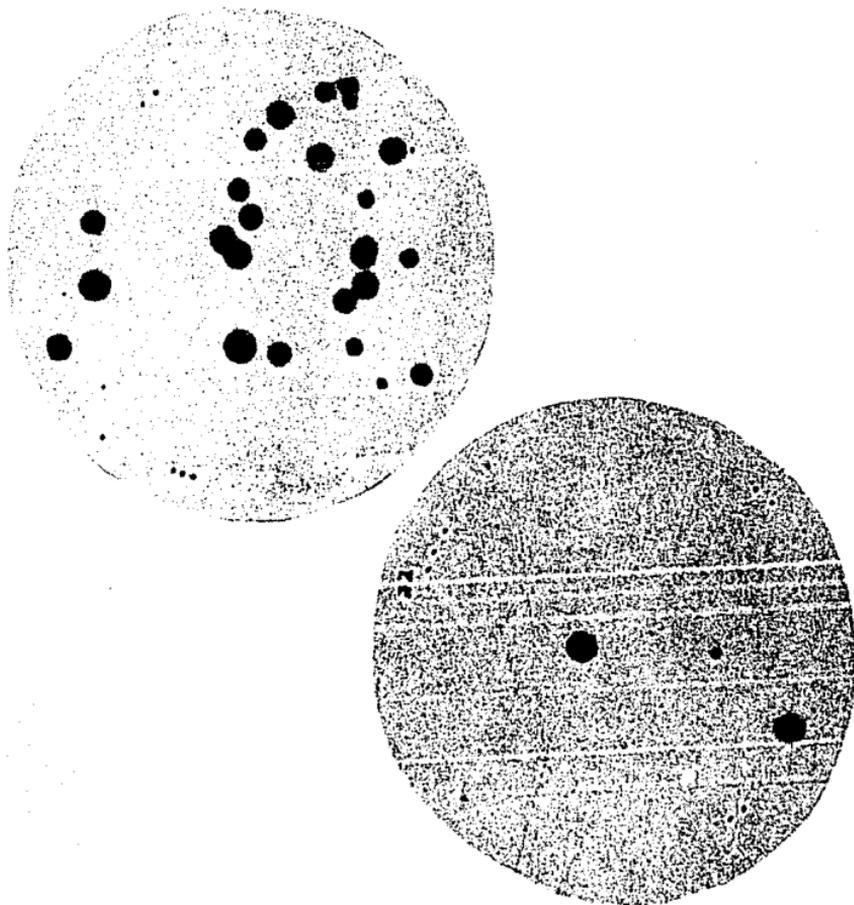


Figura 14. Autorradiografía con placas positivas obtenida en el segundo tamizado del banco en λ YES.

a b c d e f

a b c d e f

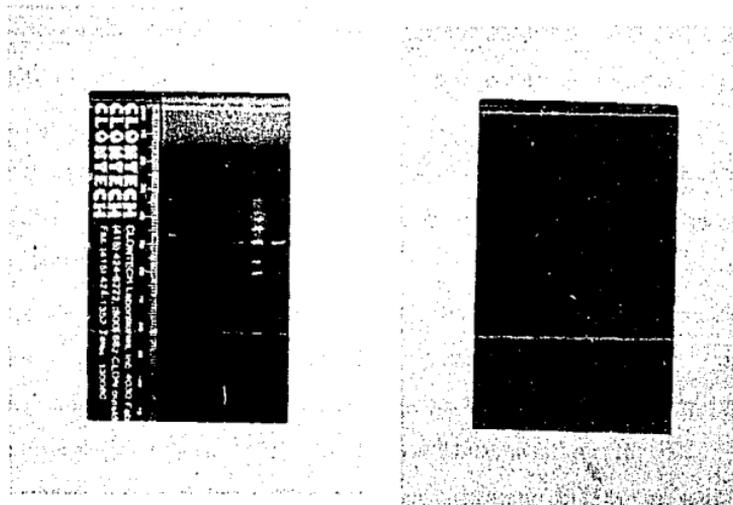


Figura 15. Southern de los plásmidos siguientes aislados del banco de cDNA de *Arabidopsis thaliana* en λ ZAP digeridos con Eco RI. a) Clona 41; b) Clona 43; c) Clona 46; d) Clona 41G; e) Marcadores de peso molecular (DNA Ladder); f) Clona 43.

Los fragmentos que dieron señal positiva en el Southern se subclonaron en pBluescript KS-. A las clonas que obtuvimos así de λ ZAP, que se muestran en la figura las llamamos 41, 43 y 46; a las que aislamos del banco en λ YES las nombramos 21, 23, 32 y 56.

II MAPEO DEL cDNA

En un mapeo como este, se tienen ubicadas las secuencias canónicas que reconocen las enzimas de restricción. Conocer esto es útil, entre otras cosas, para decidir con que enzimas vamos a digerir el cDNA que tenemos clonado, y así, obtener fragmentos de un tamaño adecuado para secuenciarlos después de ser subclonados.

Este mapa de restricción (Figura 17), se dedujo analizando por electroforesis los tamaños de diferentes segmentos de DNA obtenidos en reacciones de digestión con diversas enzimas, solas o en combinación.

Como las clonas de cDNA estaban originalmente flanqueadas por sitios que corta *EcoRI*, el inserto completo de cDNA se liberó cortando con dicha enzima.

Para realizar el mapeo, se digirieron las clonas de cDNA con *EcoRI* y diversas enzimas que no cortaban el vector; algunas de estas digestiones se ilustran en la figura 16.

Se encontró que *Bgl* II, *Eco* RV, *Xba* I y *Xho* I cortaron dentro del cDNA del gen *l-19*.

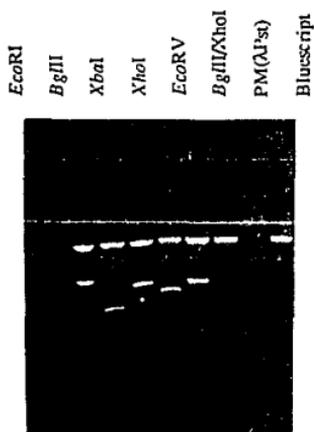


Figura 16. Fragmentos de la clona 43 obtenidos mediante digestión con diferentes enzimas, separados por electroforesis en un gel de agarosa al 1% y TBE.

Para determinar la distancia entre los sitios se digirieron las clonas con diferentes combinaciones de enzimas que cortaban dentro del inserto o bien una que cortaba dentro del inserto junto con otra que lo hacía una sola vez en el vector y cuya localización se conoce. También hay enzimas que cortan tanto en el inserto como en el vector, como en este caso, *EcoRV*, *XbaI* y *XhoI*.

De este modo, con digestiones dobles se va deduciendo distancias y al comparar los resultados de las diversas reacciones se pueden determinar las posiciones relativas de los sitios.

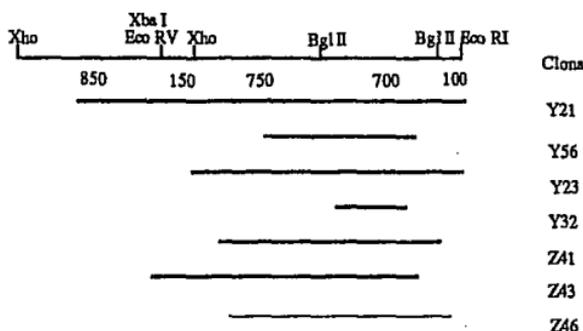


Figura 17. Mapa de restricción del ARNm del gen *l-19*

III SECUENCIA

Para secuenciar el cDNA del gen *l-19* se utilizaron las clonas obtenidas del tamizado de los bancos de λ ZAP y de λ YES y los fragmentos de restricción de ellas que se subclonaron en el plásmido Bluescript, pKS- (del banco de λ ZAP se secuenciaron la 41, la 43 y la 46, y del banco de λ YES la 21, la 56, la 23 y la 32). La secuenciación se realizó por el método de de dideoxinucleótidos, utilizando secuenasa versión 2.0, de United States Biochemical.

Se utilizaron como cebadores el cebador universal del fago M13, el reverso, el KS y el SK que se ven en el mapa del pBluescript en la figura 12. Para el DNA de doble cadena la desnaturalización

se realizó con DMSO. Se separaron las muestras por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 7% con urea durante diferentes tiempos, desde dos hasta diez horas.

Comparación de la secuencia del gen *l-19*.

Una vez leída la secuencia del gen *l-19* ésta se comparó con las secuencias reportadas existentes en el Gene Bank, encontrándose homologa con la secuencia C2814 que es un marco de lectura abierto localizado en un operón fotosintético de *Rhodobacter capsulatus*, donde también se encuentran los genes que codifican para las subunidades L, M y H del centro de reacción fotosintético y los polipéptidos B870a y B870b que unen bacterioclorofila, bacteriofitina, carotenoides y quinonas involucrados en las reacciones de la fotosíntesis (Youvan, etal, 1984) (1926 bp, lineal); y la secuencia similar a el gen *l-19* de *Arabidopsis thaliana*. El gen *l-19* codifica para un RNA mensajero de 2501 pb.

Comparación de la secuencia nucleotídica del gen *l-19* con la secuencia del gen C2814 de *Rhodobacter capsulatus*.

La secuencia de arriba es la C2814 y la de abajo la *l-19*.

El significado de los símbolos utilizados es:

G: guanina, A: adenina, T: timina, C: citosina.

| Quiere decir homologa de bases ; : significa que se insertó un boquete.

1	TCCTAAAGTT	TTCAACTTTC	TTGAGCTCA	AAAAGTACCT	CCAATGGCTT	50
51	CTTCTGCATT	TGCTTTTCCCT	TCTTACATAA	TAACCAAAGG	AGGACTTTCA	100
101	ACTGATTCTT	GTA AATCAAC	TTCTTTGTCT	TCTTCTAGAT	CTTTGGTTAC	150
151	AGATCTTCCA	TCACCATGTC	TGAAACCCAA	CAACAATTCC	CATTCAAACA	200
201	GAAGAGCAAA	AGTGTGTGCT	TCACTTGACG	AGAAGGGTGA	ATATTATTCA	250
1			ATG	AGCGCCACGC	CATCCCGCAC	23
251	AACAGACCAC	CAACTCCATT	ACTTGACACT	ATTA ACTACC	CAATCCACAT	300

24 TCCCCATCTT GACCGCGTGA CCGGTCCTGC CGATCTCAAG GCGATGAGCA 73
 |||| | |
 301 GAAAAATCTT TCTGTCAAGG AACTGAAACA ACTTTC TGAT GAGCTGAGAT 350

74 TCGCCGATCT GACGGCGCTC GCCTCCGAAG TCCGGCCGGA GATCGTCGAA 123
 || | | | | | | | | | |
 351 CAGACGTGAT CTTTAAATGTG TCGAAAACCG GTGGACATTT GGGTCAAGT 400

124 GTCGTACGCC AGACCGGGGG CCATCTTGCC TCTTCGCTGG GCGTCGTCGA 173
 | | | | | | | | | | | |
 401 CTTGGTGTG TGGAGCTTAC TGTGGCTCTT CATTACATTT TCAATACTCC 450

174 GCTGACGGTC GCGCTGCATG CGGTCTTCAA TTCACCCGGC GACAAGCTGA 223
 | | | | | | | | | | | |
 451 ACAAGACAAG ATTCTTTGGG ATGTTGGTCA TCAGTCTTAT CCTCATAAGA 500

224 TCTGGGACGT GGGGCACCAA TGCTATCCGC ACAAGATCCT GACCGGCCGC 273
 | | | | | | | | | | | | | | | |
 501 TTCTTACTGG GAGAAGAGGA AAGATGCCTA CAATGAGGCA AACCAATGGT 550

274 CGCTCGCGCA TGCTGACCCT GCGCCAGGCC GGGGGGATCT CGGGCTTTC 323
 | | | | | | | | | | | | | | | |
 551 CTCTCTGGTT TCACCAAACG AGGAGAGAGT GAACATGATT GCTTTGGTAC 600

324 GAAACGCTCC GAGAGCCCGC ATGACGCCTT TGGCGCGGGC CATTCCTCGA 373
 | | | | | | | | | | | | | | | |
 601 TGGACACAGC TCAACCACAA TATCTGCTGG TTTAGGAATG GCGGTAGGAA 650

374 CCTCGATCTC GGCGCTCTG GGCTTTGCAG TCGGTCGGGA ACTGGGCCAG 423
 | | | | | | | | | | | | | | | |
 651 GGGATTGAA GGGGAAGAAC AACAAATGTG TTGCTGTGAT TGGTGATGGT 700

424 CCGGTGGGTG ACACCATCGC GATCATCGGC GACGGCTCGA TCACCGCGGG 473
 | | | | | | | | | | | | | | | |
 701 GCGATGACGG CAGGACAGGC TTATGAAGCC ATGAACAACG CCGGATATCT 750

474 CATGGCCTAT GAGGCGCTCA ACCACGCCGG CCATCTGAAA TCGCGGATGT 523
 | | | | | | | | | | | | | | | |
 751 AGACTCTGAT ATGATTGTGA TTCTTAATGA CAACAAGCAA GTCTCATTAC 800

1024 GTGGCGGTCA CCGCGGCGAT GCCCACCGGC ACCGGTCTTG ACATCATGCA 1073
 || ||| | | || ||| | | || ||| | | || ||| |

1301 GTTGCATTTC ATGCAGCCAT GGGAGGTGGA ACCGGGTAA ATCTCTTCA 1350

1074 AAAACGCTTT CCGCGCCGGG TGTTTGACGT CGGCATCGCG GAACAGCATG 1123
 | |||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

1351 ACGTCGCTTC CCAACAAGAT GTTCGATGT AGGAATAGCG GAACAACACG 1400

1124 CGGTGACCTT TGCCGCGGGC ATGGCG-GCC GCCGGGCTGA AACCC TTCCT 1172
 | || || | | | | | | | | | | : | : | | | | | | | | | | : |

1401 CAGTTACTTT TGCTGCGGGT TTAGCCTGT- GAAGGCCTTA AACCC TTC-T 1448

1173 CGCGCT-T-T ATTCCAGCTT -CGTGCAGCG CGGC-TATGA CCAGCTCGTG 1218
 : | | : | : | | | | : | | : | | | | | | : | : | | | | | | | | |

1449 -GTGCAATCT ATTCGT-CTT TCATGCAGCG TG-CTTATGA CCAGGTTGTC 1495

1219 CATGATGTCG CGCTGCAGAA CCTGCCGGTG CGGCTGATGA TCGACCGCGC 1268
 ||||| | | ||| | | | |||| | | | | | | | |

1496 CATGATGTTG ATTTGCAAAA ATTACCGGTG AGATTGCAA TGGATAGAGC 1545

1269 CGGGCTGGTG GGGCAGGACG GGGCGACCCA TGCCGGGGCG TTCGACGTTT 1318
 || || | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

1546 TGGACTCGTT GGAGCTGATG GTCCGACACA TTGTGGAGCT TTCGATGTGA 1595

1319 CCATGCTGGC GAACCTGCCG AACTTCACCG TGATGGCGGC CGCCGACGAG 1368
 | | |||| | | | | | | | | | | | | | | | | |

1596 CATTATGCG TTGTCTTCCT AACATGATAG TGATGGCTCC ATCAGATGAA 1645

1369 GCGGAGCTTT GCCACATGST GGTGACGGCC GCGGCGCATG ACAGCGGGCC 1418
 || || | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

1646 GCAGATCTCT TTAACATGST TGCAACTGCT GTTCCGATTG ATGATCGTCC 1695

1419 GATTGCCCTG CGCTATCCGC GCGGCGAGGG GCGGGCGGTC GAGATGCCCG 1468
 | || || || || || || || || || || || || || || || ||

1696 TTCTTGTTTC CGTTACCCTA GAGGTAACGG TATTGGAGTT GCATTACCTC 1745

1469 AGCCGCGGCA AGTCTGGAA ATCGCAAGG GCCGGGCAT GACCGAAGGC 1518
 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

1746 CCGGAAACAA AGGTGTTCCA ATTGAGATTG GGAAAGGTAG AATTTTAAAG 1795

2346 GGCAAAGGTT GTGCAAAGAT TAGTATTATA GATAAACTG GTATTGTTT 2395
 2396 TGTAATTTTA GGATTGTGAT GAGATCGTGT TGTACCAATA ACTAACATCT 2445
 2446 TGTAAATCA ATTACTCTCT TGTGATCTTC AATAAGCTTG AGTGACAAAA 2495
 2496 AAAAAA 2501

Al hacer el alineamiento se encontró un 54% de homología entre estas dos secuencias.

Comparación de la secuencia de aminoácidos del gen *l-19* con la secuencia del gen C2814 de *Rhodobacter capsulatus*.

Las letras simbolizan los aminoácidos mediante el código internacional.

| Quiere decir homología de aminoácidos ; : significa que se insertó un boquete; ? quiere decir que no se trata del mismo aminoácido.

1	MASSAFAPPS	YIITRGGLST	DCKSTSLSS	SRLVTDLPS	PCLKPNNNSH	50
1		MSAT	PSRTPHLDRV	TGPADLKAMS	IADLTALASE	34
51	SNRRAKVCAS	LAKEGEYYSN	RPPTPLLDTI	NYPIMKNLS	VKELKQLSDE	100
35	VRREIVEVVS	QTGGHLGSSL	GVVELTVALH	AVFNSPGDK-	LIWDVGHQCY	83
					?? ? ? : : : ? ?	
101	LRSDVIFNVS	KTGGHLGSSL	GVVELTVALH	YIFNTPQDKI	L-WDVGHQSY	149
84	PHKILTGRRS	RMLTLRQAGG	ISGFPKRSES	PHDAFGAGHS	STSSISAALGF	133
	? ?	? ? ? ? ?	? ? ? ? ?	? ? ? ? ?	? ? ? ?	
150	PHKILTGRRG	KMPTMRQTNG	LSGFTRKRES	EHDCFQGTGHS	STTISAGLGM	199
134	AVGREL-GQP	VGDTIAIIGD	GSITAGMAYE	ALNHAGHLKS	RMFVILNDND	182
	? : ??	?????: ?	? ? ? ? ?	? ? ? ? ?	? ? ? ? ?	
200	AVGRDLKGN	NNVV-AVIGD	GAMTAGQAYE	AMNNAGYLD	DMIVILNDNK	248

163	M-SI--A--- ---PPVGLQ	HYLNTIARQ-	APFAALKAAA	EGIEMHLEGP	222	
	? : ? : : : : : ?	?? ? ? ? ? ? ? :	? ? ? : ? ? ?	? ? ? ? ? ? ?		
249	QVSLPTATLD	GPSPPVGALS	SALSRLQSNP	ALRE-LREVA	KGMTKQIGGP	297
223	VRDGARARQ	MVTA--MP-G	-GATLFEELG	FDYIGPVDGH	DMAELVETLR	268
	?? ? ? : : ? ?	? ? : : ? :	: ? ?	? ?	? ? ? ? ? ? ?	
298	MHQLA--AKV	DVYARGMISG	TGSSLFEELG	LYYIGPVDGH	NIDDLVALLK	345
269	-VTRARASGP	VLHVCTTKG	KGYP-AEGA	EDKLHGVSKF	DIETGKQKKS	316
	: ? ? ? ? ?	? ?	? : : ?	? ? ?	? ? ? ? ?	
346	EVKSTRITGP	VLHVVTTEK	RGY-PYAERA	DDKYHGVVKE	DPATGRQFKT	394
317	IPNAPN-YTA	VFERLTTEA	ARDQAIVAVT	AAMPTGTGLD	IMQKRFPRRV	365
	? : ? ? ? : ?	? ? ? ? ?	? ? ? ? ? ? ?	? ? ?	? ? ? ? ?	
395	T-NETQSYTT	YFAEALVAEA	EVDKDVVAIH	AAMGGGTGLN	LFQRRFPTRC	443
366	FDVGIAEQHA	VTFAAGMAAA	GLKPFLLALYS	SFVQRGYDQL	VHDVALQNLN	415
		? ? ?	? ?	? ? ?	? ?	
444	FDVGIAEQHA	VTFAAGLACE	GLKPFCAIYS	SFMQRAYDQV	VHDVDLQKLP	493
416	VRL-MIDRAG	LVGQDGATHA	GAFDVS-MLA	NLPNFTVMAA	ADEAELCHMV	463
	? : :	? ? ? ?	? : :	? ? ? ?	? ? ? ?	
494	VRFAM-DRAG	LVGADGPTHG	GAEDVTFM-A	CLPNMIVMAP	SDEADLFNMV	541
464	VTAAAHDSGP	IALRYPRGEG	RGVEMPER--	GEVL-EIGKG	RVMTGTEG-V	509
	? ? ? ? ?	? ? ? ?	? ? ? ? ? :	: : ? :	? ? ? : :	
542	ATAVAIDDRP	SCFRYPRGNG	IGVALPPGNK	G-VPIEIGKG	RILKEG-ERV	589
510	AILSFG-AHL	AQALKAAEML	EAE-GVSTTV	ADARFCRPLD	TDLIDR-LIE	556
	? ? ? : ? ?	? ? : ? ?	: : ? ? ?	? ?	? ? : : ? ?	
590	ALLGYGSVAQ	SC-LGAAVML	E-ERGLNVTV	ADARFCKPLD	RALI-RSLAK	636
557	GHAALITLEQ	GAMGGFGAMV	LHYLARTGQL	E-KGRAIRTM	TLPDCYIDHG	605
	? ? ? ? ?	? ? ? ?	? ? ? ? ? ?	? : ? ? ? : ?	? ?	
637	SHEVLITVEE	GSIGGFGSHV	VQFLALDGLL	DGKLKW-RPM	VLPDRYIDHG	685
606	SPEEMYAWAG	LTANDIRDTA	LAAARPSKSV	RIVHSA.		642
686	APADQLAEAG	LMPSHIAATA	LNLIGAPREA	LF.		71

Al realizar el alineamiento de estas secuencias de aminoácidos se encontró un 54.1% de identidad en 638 aminoácidos, que nos dice que los productos de esos genes se encuentran relacionados.

El perfil hidrofóbico de la proteína *L-19* se presenta en la figura 18:

Longitud de *L-19*: 718 aminoácidos
Análisis de 1 a 718

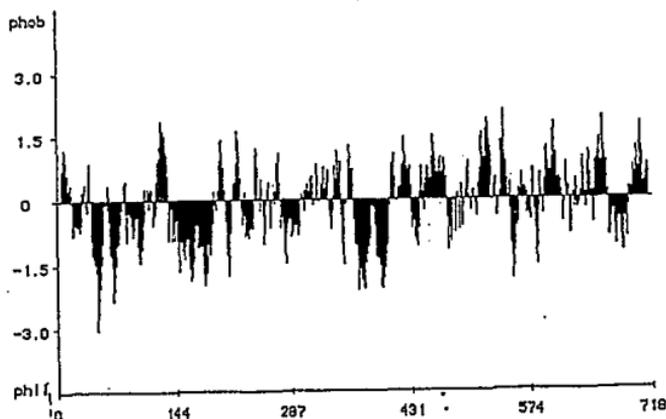


Figura 18. Perfil de hidrofobicidad de la proteína *L-19*.

IV ANALISIS DE LA EXPRESION DEL GEN *l-19*.

Análisis de la expresión del gen *l-19* en diferentes plantas y tejidos de *Arabidopsis thaliana*:

Como el gen *l-19* se encontraba en *Arabidopsis*, y en *Rhodobacter capsulatus* había un marco de lectura abierto bastante parecido, era muy probable que encontraríamos genes homólogos en otras plantas. Para ver si esta hipótesis era acertada, se analizó la expresión de este gen en tabaco, maíz, col, frijol y coliflor.

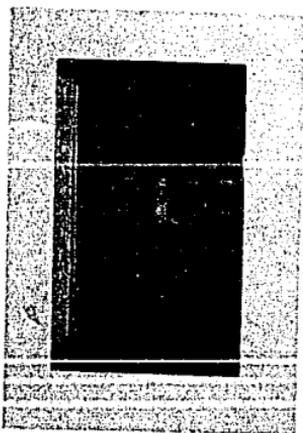
En el primer experimento se separaron muestras de RNA de la parte aérea de *Arabidopsis*, col,

tabaco y maíz, además RNA extraído de raíces de *Arabidopsis*, crecidas en cajas Petri, de un modo en que la planta completa quedaba iluminada, ya que era fácil cosecharlas. Como se puede observar en la figura 19, en el carril que corresponde a esta muestra de RNA hay una banda que corresponde al tamaño del mensajero de *l-19* que hibrida en raíz. En col también se ve una señal muy clara, mientras que en tabaco se ve muy débil y en maíz no se observa. Para ver si el mensajero de *l-19* estaba también presente en raíces crecidas normalmente, es decir, en oscuridad, se aisló RNA de raíces de plantas a las que solo les pegaba la luz en la parte aérea. Se repitió el experimento con RNA aislado de estas raíces, pero hubo problemas con la hibridación. Primero se cambiaron las condiciones de lavado; después se prepararon nuevamente las soluciones y finalmente en la hibridación del segundo y tercer Northern en lugar de utilizar Denhardt y esperma de salmón, se usó Heparina, y en lugar de hacer tres lavados sólo se realizó uno. En el segundo experimento, que se ve en la figura 20, se separaron por electroforesis RNA totales de *Arabidopsis*, col, coliflor, tabaco, maíz y frijol, se transfirieron a una membrana de Nylon y se hibridaron contra la clona de cDNA 43 marcada radiactivamente. Además se quería saber si solo se expresaba *l-19* en tejidos verdes, es decir, donde hay cloroplastos. Entonces se analizó su expresión en diferentes partes de la planta separando por electroforesis en diferentes carriles, muestras de RNA total de hoja y raíz, de *Arabidopsis* y RNA total de diferentes partes de col y coliflor como podemos observar en la figura 21. En esta autorradiografía se observa que hibridó una banda únicamente en tejido verde de *Arabidopsis* y en raíz con 30 días de edad.

NORTHERN	SSC	SDS	T de lavado	Formamida	Heparina	T hibridación
1	3X	0.1%	65°C	50%		42°C
2	2X	0.1%	42°C	40%	*	42°C
3	3X	0.1%	42°C	50%	*	42°C

A.

a b c d e f g h



B.

a b c d e f g h

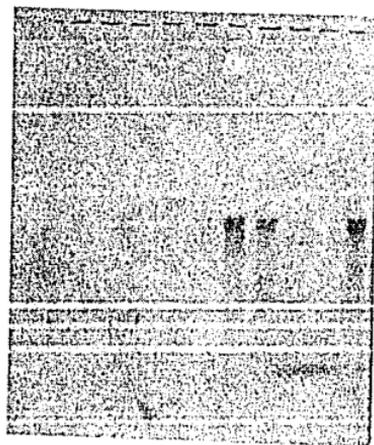


Figura 19. A. Gel con RNA. B. Autorradiografía de a) Frijol cépalos, b) Frijol talz c) Frijol hoja, d) *Arabidopsis* hoja, e) *Arabidopsis* talz, f) Tabaco, g) Maiz, h) Col.

A.

Frijol
Maíz
Tabaco
Coliflor
Col
Arabidopsis



B.

Frijol
Maíz
Tabaco
Coliflor
Col
Arabidopsis

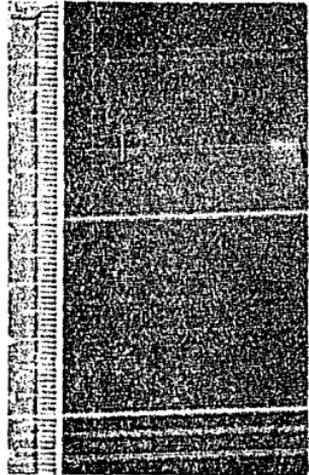
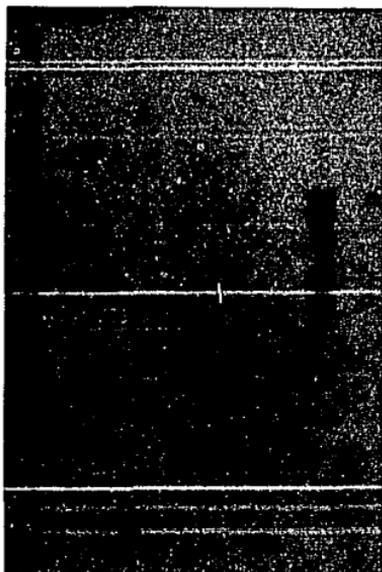


Figura 20. A. Gel con RNA aislado de tejido verde de *Arabidopsis*, col, coliflor, tabaco, maíz y frijol y separado por electroforésis. B. Autoradiografía de las muestras que se observan en el gel.

A.

a b c d e f g h i j k l m n



B.

a b c d e f g h i j k l m n



Figura 21. A. Gel con RNA aislado de diferentes tejidos de arabisidopsis, coliflor y col. a) Hoja de col; b) Flores de col; c) botone de col; d) estambres de col; e) rafces de col; f) hojas de coliflor; g) flores de coliflor; h) silicuas de coliflor; i) tallos de coliflor; j) tallos de coliflor; k) rafces de coliflor; l) tejido verde de arabisidopsis; m) raices con 15 días de edad de arabisidopsis; n) raices con 30 días de edad de arabisidopsis. B. Autorradiografía de las muestras que se observan en el gel.

DISCUSION

Lo primero que se hizo en este trabajo, fué tamizar un banco de cDNA de *Arabidopsis thaliana* en λ ZAP. Se aislaron varias clonas; al secuenciar sus extremos, se vió que no contenían la región de poliadenilación. Entonces se realizó un Southern con digestiones de estas clonas y se encontró que había segmentos de DNA que no correspondían al cDNA. Por esta razón se decidió tamizar un segundo banco de cDNA. por otro lado, se clonaron los fragmentos de cDNA que dieron señal positiva en el Southern. Se realizó la secuencia con todas las clonas de cDNA aisladas de los bancos.

Ya se sabía, por un experimento de Northern que el RNA mensajero de *l-19* mide 2500pb. La clona mas grande que se obtuvo fué la 21 que medía 2340pb. No se encontró una clona completa con los tamizados que se realizaron. Es probable que dentro del banco no exista una sola clona completa debido a la dificultad que presenta la clonación de mensajeros grandes. Aunque es cierto que la diferencia entre 2340 de la clona 21 y 2500 del tamaño del mensajero no es mucha, las otras clonas que se aislaron, eran aún mas pequeñas.

Se comparó la secuencia obtenida del gen *l-19* con las secuencias que han sido publicadas y se encuentran en un banco de datos "Genebank". Esto se realizó mediante un programa cibernético, en la computadora. Así, se encontró que la secuencia de *l-19* tiene un 54.1% de identidad con una secuencia que corresponde a un marco de lectura abierto de la bacteria fotosintética *Rhodobacter capsulatus*, nombrado C2814 y recientemente *pufX*. Como ya se había mencionado en la introducción, en el apartado de genes fotosintéticos en bacterias, dentro de los operones bacterianos se encuentran genes que se transcriben coordinadamente y están relacionadas metabólica o funcionalmente. En el caso del operón *puf*, los otros genes que se transcriben en el mismo mensajero que *pufX*, codifican para proteínas del centro de reacción, del centro de captación de luz, y hay una que se encarga de regular la concentración de bacterioclorofila en la

célula. Se puede ver que todos estos genes están involucrados en fotosíntesis. Así que se puede pensar, que también *pufX* lo está. Como *pufX* se parece significativamente a *l-19* se puede decir que estructuralmente y muy probablemente funcionalmente los productos de estos genes están relacionados. Tomando en cuenta lo anterior, se ve que la probabilidad de que *l-19* sea un gen fotosintético, es muy alta. Además, otro factor que apoya esta hipótesis fuertemente es el fenotipo de la planta que tiene mutado *l-19*, una planta albina que de algún modo tiene afectado el desarrollo del cloroplasto. Otra evidencia que tenemos que valorar, es que muchos genes fotosintéticos, como Ferredoxina A (Vorst, 1993), la bifosfatasa del ciclo de Calvin (Miles, 1993) y el fotosistema I (Anderson, 1986), por citar algunos ejemplos, son regulados por luz. Los genes del operón bacteriano *puf*, se regulan por dos factores ambientales: oxígeno e intensidad luminosa (Bauer, Buggy and Mosley, 1993). La expresión del gen *l-19* también está regulada por luz. El que un gen fotosintético de plantas se parezca a uno de bacterias no es tan sorprendente, se sabe que el centro de reacción de las bacterias púrpura comparte un ancestro común con el fotosistema II de algas y plantas terrestres (Youvan, et al, 1984).

Cuando se realizó la comparación de la secuencia *l-19* con las secuencias reportadas, encontramos que también una parte de él presentaba homología el componente E1 de la piruvato deshidrogenasa, precursor de la subunidad β con un 24.3% de identidad en 276 aa de solapamiento en el caso de una piruvato deshidrogenasa bacteriana, y un 25.8 % de identidad en 217 aa con piruvato deshidrogenasa humana lo que dice que es bastante probable, que en esa zona, ambos productos proteicos se parezcan en estructura tridimensional, y con la información que se tiene ahora sería muy aventurado decir que estuvieran relacionadas funcionalmente, aunque existe la posibilidad. Falta buscar en la literatura información sobre la piruvato deshidrogenasa, aunque se sabe que no hay estructura tridimensional publicada.

La región 5' de *l-19* no tiene contraparte en *pufX*. Aunque los péptidos de tránsito a cloroplasto no se parecen significativamente a nivel de estructura primaria como ya se había mencionado, la

región 5' del gen *l-19* comparte ciertas características comunes en los péptidos de importe a cloroplasto conocidos. En *l-19*, esta región se parece al péptido de tránsito de diferentes proteínas de cloroplasto codificadas en núcleo en que hay un 29% de S+T totales dentro del rango de los péptidos tránsito conocidos que varían de 20-35%, además tiene una longitud de 75 aa, que está entre las longitudes de péptidos tránsito conocidos: el más corto es el de CAB con 29, y el más largo es el de la acetolactato sintasa de maíz. Por último, la proteína L-19 solo tiene dos aminoácidos ácidos (Keegstra and Theg, 1989). De modo que si se toma en cuenta que esa región no existe en el gen homólogo bacteriano, y las características que tiene, se puede pensar que muy probablemente esta región sea un péptido de importe a cloroplasto.

Mutaciones en el gen *l-19* son letales, por lo que se sabe que este gen es esencial. Se observa que el RNA mensajero del gen *l-19* es abundante por la señal que se obtuvo en los experimentos de Northern, además de que se aislaron varias clonas del mismo de los bancos de cDNA. Los mensajeros y productos proteicos de genes fotosintéticos en general son bastante abundantes, entre ellos el de la RuBP carboxilasa es el más abundante. Se observa transcripción de *l-19* en hojas y raíces; así, el mensajero no solo se encuentra en tejido verde, sino también en tejidos donde los plástidos presentes no son cloroplastos. Tomando en cuenta estos experimentos se puede pensar que la proteína L-19 tiene una función general en los plástidos. Podría tratarse de un gen que regule indirectamente la expresión de otros o que module la actividad de ciertas proteínas necesarias para el ensamblaje del sistema tilacoideo. Las mutaciones en genes fotosintéticos en general tienen efectos pleiotrópicos sobre genes relacionados. No se conoce el mecanismo de comunicación entre el genoma plástidico y el nuclear, pero la información genética del núcleo modula la expresión del genoma plástidico así como la información de las proteínas del plástido codificadas en núcleo (Taylor, 1989).

Una mutación regulatoria debe tener efectos pleiotrópicos. En la mutante albina con la que trabajamos, no se encontró el RNA mensajero de la proteína que se une a clorofila (CAB). La proteína L-19 es una más cuya ausencia bloquea el desarrollo normal del cloroplasto.

Para que el desarrollo de los cloroplastos se realice normalmente, tienen que conjuntarse una serie de condiciones.

L-19 puede ser una proteína que regule el ensamblaje de este sistema, o bien que sea regulada de un modo en el que sea activa en tejido verde e inactiva en raíz, que cambie su función o estructura, de modo que pueda o no actuar sobre otras proteínas, y permitir así que haya desarrollo normal de tilacoides. En raíz encontramos el mensajero; puede ser que éste se traduzca o no y que su traducción o la actividad estén reguladas por una señal de desarrollo del plástido.

Observando los experimentos de análisis de expresión de *l-19* en diferentes plantas, vemos que obtuvimos una banda que hibridó contra nuestra sonda marcada, del mismo peso molecular que el mensajero de *l-19* de *Arabidopsis*, en el caso de col, que es una planta de la misma familia que *Arabidopsis*, en el experimento de la figura 19 se observa que col presenta una banda positiva del mismo peso molecular que el mensajero de *l-19*. En la figura 20 también se ve la misma banda, aunque más tenue, quizá porque la heparina es un mejor bloqueador que la mezcla de Denhard con esperma de salmón y en la figura 21 no hay señal, por lo que se deben modificar las condiciones de hibridación hasta encontrar el punto óptimo. Se presentó el problema de que al bajar las condiciones de astringencia, comenzaban a dar más señal los ribosomales que la banda de mensajero. Frijol no presenta señal positiva en ninguno de los experimentos, esto puede ser porque en la etapa de desarrollo en que se encontraba el tejido utilizado no se expresara el gen, porque en frijol no se exprese el gen, porque no sea tan parecido como los otros y con las condiciones de astringencia utilizadas no de señal suficiente. Por otro lado es curioso que se presente hibridación en raíz. En la mutante, que no hay cloroplastos, aunque sí otros plástidos, no hay mensajero de *l-19*, en cambio, en raíz de cierta edad, donde tampoco encontramos cloroplastos, sino amiloplastos, sí está.

Habría que hacer otros experimentos utilizando condiciones de astringencia bajas pero midiendo siempre la incorporación de marca a la sonda, porque muchos problemas derivan de hacer los experimentos con marca deficiente. Por otro lado, el que este gen se encuentre en *Rhodobacter*

capsulatus y *Arabidopsis*, así como en Tabaco, nos hace pensar que puede estar bastante conservado en otras plantas. Así, se puede realizar un Southern para ver si en el genoma de ciertas plantas y quizá algas está *l-19*. No se comenzó de este modo, porque pensamos que sería más sencillo encontrar las condiciones de hibridación adecuadas para RNA, ya que el DNA contiene intrones.

Si analizamos el perfil hidrofóbico de la proteína lo único que veremos es que no existe ninguna zona hidrofóbica de tamaño suficiente que nos hiciera pensar que se trata de una proteína de membrana.

Aún falta mucho camino por recorrer para dilucidar la función de esta proteína, pero se puede comenzar por buscar la localización e investigar la estructura.

References

- Anderson John and Beardall John. Molecular activities of Plant Cells Cap 3. Blackwell Scientific Publications, 1991: 36-49.
- Anderson, Jan M. Photoregulation of the composition, cunction, and structure of thylakoid membranes. Ann.Rev.Plant Physiol 37. Annual Reviews Inc., 1986: 93-136.
- Balcells Lluis, Swinburne June and Coupland George. Transposons as tools for the isolation of plant genes. TIBTECH 9 january, 1991: 31-36.
- Bauer Carl, Buggy Joseph and Mosley Chéré . control of Photosystem genes in *Rhodobacter capsulatus*. TIG 9(2). Elsevier Science Publishers Ltd febrero, 1993: 56-60.
- Billings W.D. Ecology and Human Welfare. Plants and the ecosystem. Wadsworth Publishing Company Inc., 1978: 149-163.
- Browse John and Sumerville Chris. Glycerolipid synthesis: biochemistry and regulation. Ann.rev.Plant Physiol Plant Mol. Biol. 42, 1991: 467-506.
- Bruijn de Frans J. and Schell Jeff. *Agrobacterium* mediated gene transfer to plants. Research Review in Biochemistry. Institute for Scientific Information Enero, 1989: 1-31.
- Chory Joanne. Out of darkness: mutants revel pathways controlling lighth-regulated development in plants. TIG 9(5). Elsevier Science Publishers mayo, 1993: 167-172.
- Cline K., Werner-Washburne, lubben and Keegstra K. J.Biol.Chem. 260, 1985: 3691-3696.
- Ehleringer James R., Sage Rowan F., Flanagan Lawrwnce B. and Pearcy Robert W. Climate change and evolution of C4 Photosynthesis. TREE 6(3) marzo, 1991: 94-98.
- Elledge Stephen etal. Proc.Natl.Acad.Sci. 88. Genetics, 1991: -1735.
- Flügge Ulf-Ingo and Heldt Hans Walter. Metabolite translocators of the chloroplast envelope. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 42. Annual Reviews Inc., 1991: 129-144.
- Funckes-Shippy, C.L., Levine, A.D. Cytokinin regulates the expression of nuclear genes required for photosynthesis. Molecular Biology of the photosynthetic apparatus. Ed. Katherine E. Steinbeck, ... [et al.]. Cold Spring Harbor, NY. : Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., 1985: 407-411.
- Govindjee and Coleman J. William. How Plants make Oxygen. Scientific American February, 1990: 42-51.
- Gruissem Wilhelm. Chloroplast gene expression: how plants turn their plastids on. Cell 56. Cell Press enero, 1989: 161-170.

Gruissem Wilhelm and Tonkyn John. Control mechanisms of plastid gene expression. Critical Reviews in Plant Science 12. CRC Press, Inc., 1993: 19-55.

Hageman Johan, Baecke Carolien, et al. Protein import and sorting inside the chloroplast are independent processes. The Plant Cell 2. America Society of Plant Physiologists Mayo, 1990: 479-494.

Hatch Marshall D. C4 Photosynthesis: a unlikely process full of surprises. Plant Cell Physiol 33(4). JSPP, 1992: 333-342.

Hugly S. and Somerville Ch. A role for membrane lipid polyunsaturation in chloroplast biogenesis at low temperature. Plant physiol. 99, 1992: 197-202.

Hugly S., Kunst L., Browse J. and Somerville C. Enhanced thermal tolerance and altered chloroplast ultrastructure in a mutant of arabidopsis deficient in lipid desaturation. Plant. physiol. 90, 1989: 1134-42.

Hugly, S.; Kunst, L.; Somerville, C., J-Hered. Linkage relationships of mutations that affect fatty acid composition in Arabidopsis. 82(6). Oxford University Press: 484-488.

Keegstra Keneth and Olsen Laura j. Chloroplastic precursors and their transport across the envelope membranes. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant mol. Biol. 40. Annual Reviews Inc., 1989: 471-501.

Koncz C., Mayerhofer R., Koncz-Kalman, Nawrath C., Reiss B., Redei P. and Shnell J. Isolation of a gene encoding a novel chloroplast protein by T-DNA tagging in Arabidopsis thaliana. EMBO Journal 9, 1990: 1337-46.

Langdale Jane A. and Nelson Timothy. Spatial regulation of photosynthetic development in C4 plants. TIG 7(6) junio, 1991: 191-195.

Theg and Varian. J.Biol.Chem. 264, 1989: 6724-29.

Maniatis, T., Sambrook J., Fritsch, E.E. Molecular cloning a laboratory manual 3, 1989.

Matheus and Van Holde. Biochemistry. 1991. The Benjamin Cummings Publishers, 1991.

Miles, A.J., Potts, S.C., Willingham, N. M., Raines, Ch.A. and Lloyd, J.C. A light- and developmentally-regulated DNA-binding interaction is common to the upstram sequences of the wheat Calvin cycle biphosphatase genes. Plant Molecular Biology 22. Kluwer Academic Publishers, 1993: 507-516.

Mullet John E. Chloroplast development and gene expression. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 39. Annual Reviews Inc., 1988: 475-502.

Possingham, John. Plastid replication and development in the life cycle of higher plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 31. Annual Reviews Inc., 1980: 113-29.

- Rawsthorne Stephen. C3-C4 intermediate photosynthesis: linking Physiology to gene expression. The Plant Journal 2(3), 1992: 267-274.
- Raven, P. H., Evert, R. and Curtis H. Biology of Plants. Worth Publishers, Inc., 1982: 71-96, 96-112, 518-536.
- Riedel, A., Rutherford, A.W. Hasuka, G. Muller, A. Nitschke, W. Chloroplast Rieske center: EPR study on its spectral characteristics, relaxation and orientation properties. 266(27) Sept, 1991: 17838-844.
- Salisbury Frank and Ross Cleon. Plant Physiology. Wadsworth Inc., 1985: 179-391.
- Sganga, Michael W. and Bauer, Carl. Regulatory factors Controlling Photosynthetic Reaction Center and Light-Harvesting gene Expression in Rhodobacter capsulatus. Cell 68. Cell Press, 6 Marzo, 1992: 945-954.
- Singer Maxine and Berg Paul. Genes & Genomes. University Science Books, 1991.
- Sjef Smeekens, Weisbeek Peter and Robinson Colin. Protein transport into and within chloroplasts. TIBS 15. Elsevier Science Publishers Ltd. febrero, 1990: 73-.
- Steven M. Theg and Sidney Varian Scott. Protein import into chloroplasts. Trends in cell biology 3. Elsevier Science Publishers Ltd (UK) junio, 1993: 186-190.
- Stratagene cloning systems. 1994 Catalog. Stratagene Cloning systems, 1994: 304.
- Stryer, L. Bioquímica Cap. Fotosíntesis. Ed. Reverté, 1988: 523-547.
- Stumpf P.K. and Conn E.E. The Biochemistry of Plants. Ed. Hatch M.D. and Boardman N.K. 8. Academic Press, 1981: 283-328.
- Taylor William C. Regulatory interactions between nuclear and plastid genomes. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 40. Annual Reviews Inc., 1989: 211-233.
- Thomson w. w. and Whatley Jean M. Development of nongreen plastids. Ann. Rev. Plant Physiol. 31. Annual Reviews Inc., 1980: 375-394.
- Vorst, O., Dam van F., Weisbeek, P. and Smeekens, S. Light-regulated expression of the Arabidopsis thaliana ferredoxin A gene involves both transcriptional and post-transcriptional processes 3(6), 1993: 793-803.
- Wiessner C., Dunger I. and Michel H. Structure and transcription of the genes encoding the B1015 light-harvesting complex beta and alpha subunits and the photosynthetic reaction center L, M, and cytochrome c subunits from Rhodospseudomonas viridis. J. Bacteriol. 172, 1990: 2877-87.
- Youvan Douglas C. Bylina Edward, et al. Nucleotide and deduced polypeptide sequences of the photosynthetic reaction center, B870 antenna, and flanking polypeptides from R. capsulata. Cell 37. MIT julio, 1984: 949-957.
- Zurawski Gerard and Clegg Michael T. Evolution of higher-plant chloroplast DNA

encoded genes: implications for structure-function and phylogenetic studies. Ann. Rev. Plant Physiol. 38. Annual Reviews Inc., 1987: 391-418.