

00562

17

2eje



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**“ESTUDIO DE LA FUNCION DE LA PROTEINA DE  
24 kDa QUE SE UNE A RNA (24RNP) DURANTE  
EL PROCESAMIENTO Y ESTABILIZACION DE LOS  
mRNAs DE CLOROPLASTO”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUIMICAS**

**P R E S E N T A :**

**GABRIELA TOLEDO ORTIZ**



MEXICO, D. F.

1998

264692

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **JURADO ASIGNADO**

**Presidente:** Dr. Jorge Vázquez Ramos.  
**Vocal:** Dra. Carmen Gómez Eichelmann.  
**Secretario:** Dra. Patricia León Mejía.  
**1<sup>er</sup> Suplente:** Dr. Roberto Coria Ortega.  
**2<sup>do</sup> Suplente:** Dr. Mario Rocha Sosa.

### **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Ciudad Universitaria, Facultad de Química, Conjunto E  
Departamento de Bioquímica, Laboratorio 105

Universidad de California en Berkeley  
Departamento de Biología Vegetal  
Koshland Hall, Laboratorio 211

**Asesor del Tema:** Dra. Herminia Loza Tavera

**Sustentante:** Q. Gabriela Toledo Ortiz

## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a las siguientes instituciones y personas:

Al CONACYT (proyecto 25199N), la Pew Foundation y la Dirección General de Asuntos de Personal Académico (DGAPA, proyecto IN205697) por el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo.

A la DGAPA por la beca que me fue concedida para mis estudios de Maestría en Ciencias Bioquímicas (periodo septiembre 1996- agosto 1998).

Al Departamento de Bioquímica de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química UNAM por permitirme llevar a cabo este trabajo en sus instalaciones.

A la Dirección General de Intercambio Académico, por la beca UNAM-Universidad de California que me fue asignada para realizar una estancia de investigación de tesis de maestría en la Universidad de California en Berkeley (septiembre 1997-marzo 1998).

Al Departamento de Biología Vegetal de la Universidad de California en Berkeley por recibirme como estudiante visitante durante ocho meses para la realización de los experimentos finales de esta tesis.

Muy especialmente a la Dra. Herminia Loza Tavera por haber sido desde que la conozco parte esencial de mi formación, por su tiempo y sus valiosas enseñanzas y al Dr. Wilhelm Gruissem por su confianza y toda la ayuda recibida para la realización de este trabajo.

Al Dr. Robert Hayes por la asesoría y consejos que me brindó durante mi estancia en el laboratorio del Dr. W. Gruissem.

Al Dr. Manuel Rodríguez por su apoyo y amistad en todo momento y por sus valiosas contribuciones durante la realización de este trabajo.

A todos los miembros del Gruissem Lab, agradeciendo infinitamente su contribución para la realización de este trabajo.

A todos mis compañeros y amigos de Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química. En especial a Carlos Mújica, Alfredo Ayala, José Luis Busto, Mireya Rodríguez y Manuela Nájera por todas las veces que me sacaron de apuros.

**A mi madre Yolanda Ortiz Ascencio con quien me hubiera gustado compartir las experiencias vividas en otra etapa más que culmina, con todo mi cariño.**

**A la persona más importante: mi padre Alejandro Toledo, quien ha estado a mi lado en todo momento y gracias a quien he podido llegar hasta este punto.**

**A mi hermano Francisco y a mi Chesi, por su compañía y apoyo.**

**A mi Tío Epi con todo mi afecto.**

**A Manolo, por haber estado conmigo en las buenas y en las malas durante la realización de este trabajo y por su invaluable amistad.**

<b>CONTENIDO</b>	
<b>ABREVIATURAS</b>	<i>i</i>
<b>RESUMEN</b>	<i>iii</i>
<b>ABSTRACT</b>	<i>iv</i>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>II. ANTECEDENTES</b>	4
1. El genoma de los plástidos.	4
1.1. Generalidades	4
1.2. Organización y expresión de sus genes	4
2. La transcripción en el cloroplasto	5
2.1. Secuencias promotoras: el primer nivel de control	6
2.2. Transcripción diferencial durante el desarrollo del cloroplasto	6
3. Los mRNAs plastidiales	7
3.1. Estabilidad	7
3.2. Regulación post-transcripcional de la acumulación de los mRNAs de cloroplasto	8
3.3. Las secuencias 3' de la región no traducida (UTR) funcionan como elementos regulatorios	9
3.4. Las proteínas de unión a RNA (RNPs) interaccionan con la 3'UTR de los mRNAs de cloroplasto	11
4. Las RNPs en el procesamiento y estabilización de los mRNAs plastídicos	11
4.1. Empleo de un sistema de procesamiento <i>in vitro</i> para el estudio de la generación de los extremos 3' maduros de mRNAs de cloroplasto	13
4.2. Identificación de un complejo de alto peso molecular involucrado en el procesamiento de extremos 3' de mRNAs de cloroplasto	13
4.3. Las RNPs pequeñas	15
4.3.1. La 33RNP	18
4.3.2. La 28RNP	18
4.3.3. La 24RNP	19
<b>III. HIPÓTESIS</b>	19
<b>IV. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b>	21
<b>V. OBJETIVOS</b>	22
<b>VI. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	24
1. Material Biológico	24
2. Clonación de la 24RNP de espinaca en un vector de expresión bacteriano	24

2.1. Reacciones de amplificación por PCR	24
2.2. Clonación del producto de PCR	25
2.3. Obtención de DNA plasmídico	27
2.4. Secuenciación	27
3. Producción y análisis de la 24RNP de espinaca recombinante	27
3.1. Electroforesis de proteínas	27
3.2. Western blot	28
3.3. Inducción de la expresión de la 24RNP en bacterias	28
3.4. Expresión en pequeña escala	28
3.5. Localización sub-celular	28
3.6. Purificación de la 24RNP	31
4. Obtención de la 28RNP recombinante	32
1. Clonación en PVX	33
2. Infección de plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	35
3. Fraccionamiento celular de tejido	35
5. Análisis de la actividad de procesamiento in vitro de extremos 3' de mRNAs de cloroplasto	33
5.1. Electroforesis de RNA en geles de acrilamida	34
5.2. Obtención de un extracto de procesamiento	36
5.3. Transcripción <i>in vitro</i> de RNAs	37
5.4. Procesamiento in vitro de extremos 3' de mRNAs de cloroplasto	40
5.5. Ensayos de entrecruzamiento por luz UV	42
6. Inmunosustracción de extractos de procesamiento RNA de cloroplastos de espinaca	44
6.1. Inmunoprecipitación por acoplamiento del anticuerpo a proteína A	44
6.2. Purificación de anticuerpos por afinidad	45

## VII. RESULTADOS

1. Clonación de la 24RNP en un vector de expresión bacteriano	47
2. Obtención de la proteína recombinante	48
3. Preparación de un extracto de procesamiento de mRNAs	53
4. Purificación del anticuerpo anti-24RNP	54
5. Inmunosustracción del extracto de procesamiento	56
6. Obtención de la 28RNP recombinante	59
7. Purificación de la 28RNP recombinante	65
8. Estimación de la cantidad de 24RNP y 28RNP en el extracto de procesamiento	67
9. Verificación de la capacidad de las proteínas recombinantes de unirse a RNA	69
10. Experimentos de reconstitución del extracto inmunosustraido con anticuerpo anti-24RNP	70

11. Inmunosustracción con anticuerpo anti-28RNP	73
12. Experimentos de reconstitución	74
<b>VIII. DISCUSIÓN</b>	<b>76</b>
1. Producción de la 24RNP en un sistema bacteriano	76
2. Producción y purificación de la 28RNP recombinante	78
3. Purificación del anticuerpo anti-24RNP	80
4. Experimentos de reconstitución del extracto inmunosustraído con el anticuerpo anti-24RNP	82
5. Experimentos de reconstitución del extracto inmunosustraído de la 28RNP	80
6. La 24RNP está involucrada en la determinación de los mensajes de cloroplasto	84
<b>XIX. PERSPECTIVAS</b>	<b>86</b>
<b>X. CONCLUSIONES</b>	<b>90</b>
<b>X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>91</b>



## Abreviaturas.

APS	Persulfato de amonio.
ATA	Ácido aurín-tricarboxílico.
BEP	Buffer de extracción de proteínas.
BSA	Albúmina de suero bovino.
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario.
cpm	Cuentas por minuto.
Ci	Curie
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
dNTPs	Deoxirribonucleótidos trifosfato
D.O.	Densidad óptica.
DMP	Dimetil pimelimidato.
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> .
EE	Extracto de cloroplastos de espinaca.
EI	Extracto de procesamiento inmunosubstraído.
EP	Extracto de procesamiento de extremos 3' de mRNAs de cloroplastos de espinaca
ES	Extracto de procesamiento incubado con suero preinmune.
FS I	Fotosistema I.
FS II	Fotosistema II.
G	Energía libre de Gibbs.
g	Gramos
h	horas
IPTG	Isopropil-tio $\beta$ -D-galactósido.
IR	Secuencias invertidas repetidas.
kD	Kilodaltones.
kb	Kilobases
L	Litro
LB	Medio Luria-Bertoni.
M	Molaridad.
mA	Miliamperes.
mg	Miligramos.
mM	Milimolar.
min	Minutos.
mRNA	Ácido desoxirribonucleico mensajero.
nt	Nucleótidos.
<sup>32</sup> p	Isótopo radiactivo de fósforo.
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida.
pb	Pares de bases.
PBS	Solución salina de fosfatos.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PNPasa	Polinucleótido fosforilasa.
PVX	Virus X de la papa.

24R	Proteína 24RNP de espinaca recombinante.
28R	Proteína 28RNP de espinaca recombinante.
RNA	Ácido ribonucleico.
RNA-H	Ácido ribonucleico marcado radiactivamente para experimentos de procesamiento <i>in-vitro</i> .
RNAse	Ribonucleasa.
RNP	Ribonucleo proteina.
RNA-X	Ácido ribonucleico marcado radiactivamente para experimentos de entrecruzamiento por luz ultravioleta.
rpm	Revoluciones por minuto.
Rubisco	Ribulosa 1,5- bis fosfato carboxilasa
s	Segundos.
SDS	Dodecil sulfato de sodio.
µg	Microgramos.
µl	Microlitros.
UTR	Región no traducida.
Zeo	Zeocina

## RESUMEN

El control post-transcripcional es un mecanismo importante para la regulación de la expresión genética en el cloroplasto. Los extremos 3' de los mensajes cloroplásticos deben ser procesados para generar mRNAs estables y funcionales. Con el fin de estudiar *in vitro* la maquinaria de procesamiento de extremos 3' de mensajes cloroplásticos, a partir de cloroplastos de espinaca fue purificado un extracto proteico capaz de procesar correctamente las regiones 3' no traducidas (3' UTR) (EMBO J. 10: 1493-1502). En fecha reciente, haciendo uso de dicho extracto fue aislado un complejo de alto peso molecular involucrado en el procesamiento de mRNAs y formando parte del complejo de alto peso molecular fueron identificadas varias actividades de RNAsas (EMBO J. 15: 1132-1141). Además, asociadas con el complejo se encontraron tres proteínas pequeñas de unión a RNA (RNPs). Una de éstas RNPs pequeñas es la 24RNP que fue aislada por cromatografía de DNA de cadena sencilla y HPLC (Abrahamson, no publicado). La 24RNP, al igual que la mejor estudiada 28RNP (EMBO J. 15: 1132-1141) se une a extremos 3' de diferentes mRNAs cloroplásticas. Tomando en consideración las semejanzas estructurales que existen entre la 24RNP y la 28RNP y el hecho de que la 28RNP es importante para definir el sitio de procesamiento la 3' UTR, en este trabajo se propuso investigar si las 24RNP desempeña también una función relevante en este proceso. Para comprobar nuestra hipótesis, se trabajó con el sistema *in vitro* en el que la 3' UTR del gen *petD* marcada radiactivamente es procesada a una forma estable en presencia del extracto proteico de cloroplastos de espinaca. La aproximación experimental seguida incluyó la inmunosubstracción del extracto de espinaca empleando anticuerpos anti-24RNP y anti-28RNP y los extractos inmunosubstraídos se usaron para experimentos de reconstitución con las proteínas recombinantes 24RNP y 28RNP de espinaca producidas y purificadas a partir de un sistema bacteriano (pQE) o viral (PVX). Los resultados obtenidos indicaron que la función de la 24RNP no es la misma que la de la 28RNP: la 28RNP se encuentra involucrada en la definición del sitio correcto de procesamiento para la generación del extremo 3' maduro, en tanto que la 24RNP parece que está involucrada con dar estabilidad general al mensaje.

## ABSTRACT

Post transcriptional regulation is an important mechanism controlling chloroplast gene expression. Chloroplast mRNA 3' ends must be processed to produce stable, functional mRNAs. A chloroplast protein extract able of correctly process 3' untranslated regions (3' UTR) *in vitro* has been isolated from spinach. From this extract a high molecular weight protein complex has been further purified. In this complex several RNase activities have been identified (EMBO J. 10: 1493-1502). Associated with this complex, three small RNA binding proteins (RNPs) have been observed. One of these proteins isolated by DNA chromatography and reverse phase HPLC is the 24RNP that, as the better studied 28RNP (EMBO J. 15: 1132-1141), binds 3' UTR of at least four different chloroplast mRNAs. Considering structural similarities, and the fact that the 28RNP determines the correct site for 3' UTR processing, we propose that the 24RNP has also an important role in this process. To test this hypothesis we used an *in vitro* analysis where a radioactive 3' UTR *petD* precursor is processed to form a stable product in the presence of an extract with RNA processing activity. The spinach chloroplast processing extract was immunosubtracted using an antibody against the 24RNP. Due to the similarities between the 24 and the 28RNPs, the antibody recognized both proteins. Therefore, to perform reconstitution experiments we overproduced in a bacterial expression vector (pQE30) the His tagged spinach 24RNP and purified the recombinant protein. Also, the spinach 28 RNP without the transit peptide was cloned in a PVX viral vector and the protein overexpressed was purified from infected *Nicotiana benthamiana* plants. With the reconstitution experiments done, we observed that the 24RNP does not have the same role as the 28RNP in chloroplast mRNA 3' end processing mechanism. Results obtained indicate that the 28RNP is involved in the correct processing of the precursor to generate a mature 3' end and the 24RNP could have a main role in message stabilization.

## I. INTRODUCCIÓN.

El desarrollo del cloroplasto y la diferenciación de los plástidos son eventos críticos durante el crecimiento de las plantas y se asocian con cambios morfogénicos y moleculares significativos en el organelo. Por ejemplo, durante el desarrollo de cloroplastos fotosintéticamente activos a partir de proplástidos no diferenciados, los niveles de varias proteínas y de sus mRNAs se incrementan significativamente. Experimentos realizados en espinaca, tabaco y cebada, han demostrado que durante el desarrollo y diferenciación de este organelo inducidos por luz, la frecuencia de transcripción relativa de varios genes se mantiene casi constante, observándose sin embargo, una diferencia significativa en la abundancia relativa de sus mRNAs (Deng y Gruissem, 1987; Mullet y Klein, 1987; Deng *et al.*, 1987). Estos resultados indican que la regulación post-transcripcional, ya sea a nivel de procesamiento o de estabilización de los mRNAs, desempeña un papel importante en el control de la expresión genética en el cloroplasto (Gruissem *et al.*, 1988; Deng *et al.*, 1989; Tonkyn *et al.*, 1992). El procesamiento de los extremos 3' de los mRNAs de cloroplasto es necesario para producir mensajeros estables y funcionales. La actividad de procesamiento *in vitro* de extremos 3' ha sido estudiada empleando extractos purificados de cloroplastos de espinaca en donde se incuban precursores de extremos 3' marcados radiactivamente. En este ensayo, un fragmento de mRNA de menor tamaño que el precursor es generado y puede ser detectado por electroforesis en gel de acrilamida y autoradiografía (Schuster y Gruissem, 1991).

Experimentos de entrecruzamiento por luz ultravioleta con extremos 3' de la región no traducida (UTR) han proporcionado evidencias de que las UTRs de diferentes mRNAs interaccionan con varias proteínas. Algunas proteínas parecen unirse a diferentes secuencias invertidas repetidas (IR) en tanto que otras son específicas para ciertos mensajes. Una caracterización de los extractos proteicos con estas características, demostró la presencia de exo- y endo-nucleasas que forman parte de un complejo de procesamiento de alto peso molecular. Además, asociadas al complejo se encuentran tres pequeñas proteínas de unión a RNA. La 28RNP fue la primera proteína aislada a partir del extracto de cloroplastos de espinaca y clonada en base a su co-fraccionamiento con la actividad de procesamiento del extremo 3'. Por medio de una columna de DNA de cadena sencilla y HPLC, se aisló también

la 24RNP. Esta proteína al igual que la mejor estudiada 28RNP, se une a extremos 3' de la UTR de diferentes mensajes de cloroplasto y está también codificada en el núcleo. Un análisis de las secuencias de sus cDNAs demostró que estas proteínas presentan una organización similar: ambas tienen un péptido de tránsito que las dirige al cloroplasto, un dominio ácido característico que se convierte en la región amino terminal de la proteína madura y dos dominios consenso de unión a RNA separados por una región interdominios (Schuster y Gruissem, 1991; Abrahamson *et al.*, no publicado). Ni la 24RNP ni la 28RNP poseen actividad de nucleasa. Se ha propuesto que ambas podrían interaccionar a través de su dominio ácido terminal, con una nucleasa específica dirigiendo de esta manera el procesamiento correcto de los extremos 3'. En ausencia de la 28RNP la nucleasa falla en detenerse y puede proceder a través de la UTR 3' o bien realizar cortes no específicos (Schuster y Gruissem, 1991; Hayes *et al.*, 1996).

Considerando las similitudes entre la 24 y la 28RNPs y el hecho de que se ha demostrado que la 28RNP está involucrada en la definición del sitio correcto de procesamiento para la generación de extremos 3' maduros, se propone investigar si la 24RNP puede estar también involucrada en este proceso.

## II. ANTECEDENTES

Los plástidos son organelos que contienen DNA y llevan a cabo numerosas funciones metabólicas incluyendo: fotosíntesis, síntesis de almidón y biosíntesis de hormonas, lípidos, terpenos, aminoácidos y tetrapirroles (Sugiura, 1992). El desarrollo de cloroplastos fotosintéticamente activos a partir de los proplástidos que carecen de pigmentos y membranas internas es una de las transiciones morfogénicas más importantes durante la formación de cotiledones y hojas en las plantas. Entre los cambios más visibles se encuentra la acumulación de clorofila y el desarrollo de un sistema membranal tilacoidal. Muchas proteínas fotosintéticas y sus mRNAs aparecen durante el proceso de enverdecimiento. Además de la luz, que desempeña un papel complejo en la coordinación y control de la expresión de los genes nucleares y del cloroplasto, el programa de desarrollo de la planta también regula la acumulación de varios mRNAs (Gruissem, 1989; Sexton *et al.*, 1990). En contraste, en tejidos no fotosintéticos, los proplástidos se diferencian a otro tipo de plástidos especializados como los amiloplastos en la raíz, en los cuales los mRNAs de las proteínas fotosintéticas no son detectables o se encuentran presentes en muy bajos niveles. Los proplástidos también pueden diferenciarse a plástidos de otro tipo, con una función diferente como son los cromoplastos en el fruto de las zanahorias o el tomate por ejemplo. Durante el desarrollo de los cromoplastos, las membranas tilacoidales se desintegran y las proteínas fotosintéticas y sus mRNAs desaparecen (Sugiura, 1992). Sin embargo, la diferenciación a plástidos especializados no es un proceso terminal ya que en ellos se mantiene aún la capacidad para convertirse en cloroplastos (Herrmann *et al.*, 1985; Mayfield y Huff, 1986).

El DNA del cloroplasto y el genoma nuclear en conjunto codifican las proteínas de la cadena transportadora de electrones y del sistema de transcripción y traducción plastídica. Además, los genes del cloroplasto codifican sus propios tRNAs y rRNAs (Palmer, 1990). Aunque se ha demostrado que existe un nivel basal de expresión genética en todos los tipos de plástidos, se ha observado que durante la biogénesis del cloroplasto ocurre un incremento importante en la transcripción (Abler y Green, 1996). Esto podría sugerir que un punto central de regulación en la diferenciación del cloroplasto es la transcripción. Por lo tanto, la activación de la transcripción de los genes de los plástidos debe coordinarse con la

activación de la expresión de genes nucleares por señales que son transmitidas entre los plástidos y el núcleo.

## **1. El genoma de los plástidos.**

### **1.1 Generalidades**

La mayoría de los genomas de los plástidos son circulares y tienen un tamaño que va de 120 a 217 kb (Palmer, 1990). La variación en el tamaño del genoma del plástido se relaciona principalmente con el tamaño de las secuencias invertidas repetidas presentes. Los plástidos tienen de 22 a 300 copias de su genoma, dependiendo de la etapa de desarrollo (Bendich, 1987). El genoma se encuentra en la porción soluble o matriz, pero asociado a membranas, formando complejos con proteínas, se asemeja un poco a los nucleoides bacterianos y contiene aproximadamente 135 genes que se clasifican en tres categorías principales: genes que codifican proteínas y RNAs relacionados con la transcripción y la traducción del genoma del plástido (subunidades de las RNA polimerasas, tRNAs, rRNAs, proteínas ribosomales, factor de iniciación 1); genes que codifican proteínas del aparato fotosintético (Rubisco, Fotosistema I (FSI), Fotosistema II (FSII), ATP sintasa, complejo citocromo) y genes que codifican proteínas del complejo NADH oxidoreductasa (Mullet, 1993).

### **1.2. Organización y expresión de sus genes**

La mayor parte de los genes del genoma cloroplástico se encuentra organizada en operones complejos que se conservan entre cloroplastos de especies vegetales diferentes (Westhoff y Herrmann, 1988; Sugiura, 1992). Estos operones muestran que los genes con funciones comunes co-localizan en un operón. Por ejemplo: el operón *rpoB-rpoC1-rpoC2* codifica subunidades de la RNA polimerasa, en tanto que el *psbI-psbK-psbD-psbC* codifica proteínas del FS II. Algunos operones contienen genes involucrados únicamente en la transcripción (operón *rpoB*), traducción (operón *rrn*) o transcripción y traducción (*rpl23*), pero no para fotosíntesis. La localización de los genes que codifican proteínas de un solo complejo proteico en operones facilita la acumulación coordinada de las subunidades. Esta organización ofrece también la oportunidad de una regulación diferencial de la transcripción



de algunos genes involucrados en transcripción/traducción independientemente de los genes para fotosíntesis (Barkan, 1988). Otros operones son mezclas de genes que codifican proteínas con diferentes funciones. Por ejemplo *rps14* (proteína ribosomal) se co-transcribe con *psaA-psaB* (subunidades del FS I), *rpoA* (subunidad de la RNA polimerasa) con genes para proteínas ribosomales y *psbB/psbH* (subunidades del FS II) con *petB/petD* (complejo citocromo).

La distribución de genes que codifican proteínas con diferentes funciones en operones separados puede estar relacionada en parte, con los diferentes requerimientos de producción de proteínas. La abundancia de las proteínas codificadas en los plástidos varía desde la subunidad grande de la Ribulosa 1,5- bisfosfato carboxilasa (Rubisco) que es una de las proteínas más abundantes, seguida de proteínas que se encuentran involucradas en el transporte de electrones, ribosomas y subunidades de la RNA polimerasa (Rapp *et al.*, 1992).

La expresión de genes específicos con funciones diversas involucra diferentes niveles de regulación incluyendo combinaciones complejas promotor/terminador, procesamiento selectivo de RNA, estabilidad diferencial de RNAs, transcripción regulada y recambio proteico (Abler y Green, 1996).

## **2. La transcripción en el cloroplasto.**

Estudios iniciales de los genes de cloroplasto identificaron promotores de la transcripción en las posiciones -10 (TATAA) y -35 (GTGACA), así como sitios de unión para ribosomas (GGAGG) muy semejantes a elementos de transcripción y traducción procariotes (Mullet, 1988; Igloi y Kossel, 1992; Cohen, 1995). Además se identificaron RNA polimerasas tipo procariote y ribosomas 70 S. Homologías en secuencia entre genes plastidiales y bacterianos dieron evidencias adicionales de un origen común. Otra evidencia significativa de esta relación fue la presencia de operones plastídicos, que poseen el mismo orden que sus contrapartes en *E. coli* (Sugiura, 1992). Experimentos de transcripción tipo "run-on" para plástidos (Deng *et al.*, 1987) proporcionaron el primer análisis directo de la importancia de la regulación a nivel post-transcripcional de la expresión genética en los plástidos. Estos experimentos revelaron una amplia diferencia en las frecuencias de

transcripción entre los distintos genes codificados en el cloroplasto y los niveles de los mRNAs durante el desarrollo del cloroplasto inducido por luz (Gruissem, 1989b; Mullet, 1993)

### **2.1. Secuencias promotoras: el primer nivel de control.**

El primer punto que puede regular la expresión genética en el cloroplasto es la iniciación de la transcripción. La RNA polimerasa de cloroplasto reconoce secuencias promotoras que se localizan río arriba y para ciertos genes como la subunidad grande de la Rubisco (*rbcL*), las secuencias promotoras se encuentran altamente conservadas en plantas superiores (Zurawski y Clegg, 1987). Los promotores plastidiales dirigen la transcripción con diferentes eficiencias (Gruissem y Zurawski, 1985) y la fuerza del promotor puede atribuirse directamente a diferencias en su secuencia de DNA. Este sería el primer nivel de regulación que establece la transcripción basal.

### **2.2. Transcripción diferencial durante el desarrollo del cloroplasto.**

Los proplástidos, progenitores de los cloroplastos, son organelos pequeños (0.1-1  $\mu\text{m}$  de diámetro), no fotosintéticos, con bajo número de copias de DNA y bajos niveles de transcripción y de RNA. Los proplástidos se convierten en cloroplastos durante el desarrollo de las células del mesófilo en hojas. Los pasos en este proceso de desarrollo se han estudiado extensivamente en monocotiledóneas y se sabe que el primer paso en el desarrollo del cloroplasto en las hojas, involucra la activación de la síntesis de DNA plastidial y la replicación de los plástidos. Esto ocurre mientras las células se encuentran en el meristemo basal de la hoja y se requiere para mantener el número de plástidos y el contenido de DNA en las células en división. Esta primera etapa es controlada por medio de la expresión de genes nucleares. La actividad de transcripción y los niveles de RNA se mantienen bajos, pero se incrementan dramáticamente cuando entran a la zona de alargamiento celular y esta etapa en el desarrollo del cloroplasto es seguida por la activación de genes nucleares y plastidiales que codifican el aparato fotosintético. La expresión coordinada de genes nucleares y plastidiales en esta etapa requiere de una señal por parte del plástido que es necesaria para incrementar la expresión de genes nucleares que codifican el aparato fotosintético (Taylor, 1989). Si el desarrollo del cloroplasto es bloqueado por inhibidores de la transcripción (o

por mutantes con deficiencias en los ribosomas), la producción de esa señal plastidial no existe. Finalmente, en los cloroplastos maduros, la transcripción decrece y la transcripción diferencial de *psbA* y *psbD* inducida por luz ayuda a mantener la síntesis de estas proteínas en los cloroplastos maduros (Sexton *et al.*, 1990)

### **3. Los mRNAs plastidicos**

#### **3.1. Estabilidad**

Ensayos de estabilidad de los mRNAs de plástidos revelaron que éstos tienen una vida media que va de 6 a 40 h (Klaff y Gruiissem, 1991). En contraste, la estabilidad de la mayoría de los mRNAs de *E. coli* va de 20 s a varios minutos. Así, se observa que la estabilidad de los mensajes cloroplásticos es similar a la de los organismos eucariotes. Una vida media elevada en un mensaje significa que su estabilidad es un determinante importante. La iluminación de trigo de 4-5 días crecido en oscuridad, produce un incremento de 5 veces el nivel de transcripción en un periodo de 24 h (Mullet y Klein, 1987). La alta estabilidad de los mRNAs de plástidos puede ayudar a explicar por que algunos cambios en la transcripción inducidos a las 12 h de iluminación no se encuentran acoplados con cambios en la población de mRNAs (Krupinska y Apel, 1989). Además, diferencias en la estabilidad de los mRNAs citoplásmicos y cloroplásticos pueden llevar a cambios en la población, posteriores al proceso de transcripción. Así, la importancia general de la estabilidad de los mRNAs plastidiales se encuentra bien documentada.

#### **3.2. Regulación post-transcripcional de la acumulación de mRNAs de cloroplasto.**

Experimentos hechos en trigo mostraron que los niveles de mRNAs de *psaA-psaB* y *atpB* correlacionaban con cambios en la frecuencia de transcripción. Sin embargo, para otros genes como *psbA* no existía una correlación directa, lo que sugirió que la estabilidad de los mRNAs desempeñaba un papel importante. Estudios similares llevados a cabo en cloroplastos de espinaca, amiloplastos de raíz y cromoplastos de tomate permitieron concluir que en los plástidos, la regulación a nivel transcripcional es limitada (Deng y Gruiissem, 1987 y 1988). Observaciones hechas por Bendich (1987) indicaron que el número de copias de DNAs plastidiales y la abundancia de los ribosomas se incrementaba dramáticamente durante

el desarrollo del cloroplasto, que la síntesis de rRNAs estaba limitada por el molde y que el incremento en el número de copias de DNA durante el desarrollo del cloroplasto se hacía necesario para activar la síntesis de rRNA. Esta hipótesis sugería que la expresión de algunos genes plastidiales no estaba limitada transcripcionalmente y que la regulación podría ocurrir post-transcripcionalmente por estabilización de mRNAs, traducción e incluso recambio de proteínas (Stern y Grussem, 1987; Stern y Kindle, 1993).

La acumulación de transcritos durante el desarrollo del cloroplasto inducida por luz ha sido estudiada en diferentes especies. La acumulación de transcritos como *psbA* (proteína Q<sub>B</sub> de 32 kDa que forma parte del fotosistema II), *rbcL*, *atpB-E* y otros transcritos de proteínas fotosintéticas siguen un patrón similar durante el desarrollo del cloroplasto inducido por luz en trigo, maíz, chícharo y espinaca (Klein y Mullet, 1987; Sasaki *et al.*, 1987). Los cambios en los niveles de mRNAs pueden resultar de una transcripción alterada de los genes plastidiales (control transcripcional) o del recambio de mRNAs (control post-transcripcional).

Ensayos de transcripción tipo “run on” han sido utilizados para determinar la relación entre los cambios en la transcripción de genes individuales y la acumulación de sus mRNAs durante el desarrollo y la diferenciación de los plástidos (Mullet y Klein, 1987; Deng y Grussem, 1987; Deng *et al.*, 1987; Grussem, 1989). Los resultados indicaron que para todas las etapas estudiadas del desarrollo del cloroplasto, la transcripción y la acumulación de los mRNAs son independientes para la mayoría de los genes estudiados. Esto mostró la importancia que tiene el control post-transcripcional para la regulación de la expresión genética en el cloroplasto a un nivel más fino que la transcripción. Por ejemplo, los cambios en la transcripción de *psbA*, *rbcL* y *atpB-E* en espinaca no son suficientes para explicar la acumulación diferencial de sus mRNAs. Resultados similares se tuvieron para *psaA-psaB*, que codifican componentes del fotosistema I. Estos estudios sostienen que el control post-transcripcional en la expresión genética de los plástidos es un mecanismo que permite la acumulación diferencial de la mayoría de los mRNAs durante el desarrollo del cloroplasto (Grussem *et al.*, 1988).

En resumen, ajustes en la estabilidad de los mRNAs de los plástidos puede llevarse a cabo durante el ciclo de vida de la planta, desempeñando un papel regulatorio tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas. En contraste, la fuerza relativa de los promotores se mantiene, de modo que los niveles de transcripción basal no presentan alteración (existen por supuesto, algunas excepciones a este modelo general) (Gruissem *et al.*, 1986 a; Gruissem *et al.*, 1986b).

### **3.3. Las secuencias 3' de la región no traducida (UTR) funcionan como elementos regulatorios en cis para la estabilización de los mRNAs.**

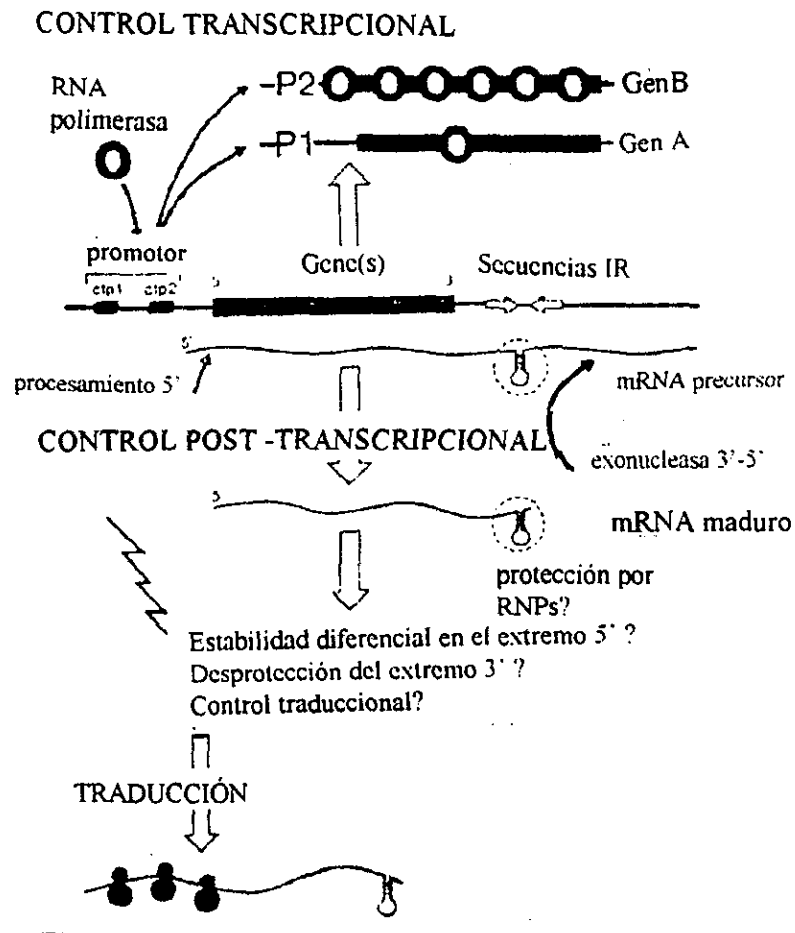
Los terminadores de la transcripción en bacterias, por lo general consisten en una serie de residuos de uridina localizados en la región 3' de los transcritos, precedidos por una secuencia invertida repetida (IR) rica en residuos GC y capaz de formar estructuras tallo-asa (Stern y Gruissem, 1989). Las 3' IR se conservan por lo general en mRNAs plástidicos específicos entre plantas evolutivamente divergentes (Zurawski y Clegg, 1987).

Todas las IR poseen  $\Delta G$ s negativos y se localizan en los extremos 3' de transcritos mono y policistrónicos o inmediatamente después de cada región codificante en un transcrito policistrónico. En los procariotes, se estableció que las IR funcionan como terminadores eficientes de la transcripción, además de que protegen de la degradación exonucleolítica 3' aumentando con ello la vida media de los mensajes (Sugita y Sugiura, 1996).

Sin embargo, en los plástidos, las mitocondrias y algas como *Chlamydomonas reinhardtii*, las IR no son terminadoras efectivas de la transcripción, más bien funcionan como elementos de procesamiento (Stern y Gruissem, 1987; Chen y Orozco, 1988, Dombrowski *et al.*, 1997; Rott *et al.*, 1998). En experimentos realizados *in vitro* e *in vivo* (Stern y Gruissem, 1989; Stern *et al.*, 1991; Rochaix, 1996) se ha observado que las secuencias 3' IR ayudan a estabilizar segmentos de mRNA que se encuentran hacia 5' (Gruissem *et al.*, 1988; Bandziulis *et al.*, 1989).

Mutagénesis de las secuencias 3' UTR del mRNA del gen *psbA* y otros mostraron que las secuencias en la región del asa y el tallo de la IR 3' pueden ser el sitio de corte para nucleasas específicas *in vitro* (Stern *et al.*, 1989; Schuster y Gruissem, 1989; Chen y Stern, 1991; Hayes *et al.*, 1996). Sin embargo, se tiene claro que las IR por sí solas no son

suficientes para la estabilización y el procesamiento de los mRNAs (Gruissem, 1989; Sugita y Sugiura, 1996).



**Figura 1. Modelo para el control transcripcional y post-transcripcional de la expresión genética en el cloroplasto.** A nivel de transcripción P1 y P2 representan promotores de diferente fuerza que junto con la RNA polimerasa y posiblemente proteínas específicas de unión a DNA establecen la frecuencia de transcripción para los genes A y B. La RNA polimerasa pasa por las secuencias IR de la región 3' UTR para producir transcritos mono- y poli- cistronicos, que requerirán de procesamiento en la región 3'. La acumulación y estabilidad diferencial de los transcritos de cloroplasto puede estar mediada por la unión de RNPs a las 3' IR. Los transcritos también sufren de modificaciones en el extremo 5'.

(Tomada de Gruissem, 1989b).

### **3.4. Las proteínas de unión a RNA (RNPs) interactúan con la 3' UTR de los mRNAs de cloroplasto.**

Experimentos con geles de retardamiento y de entrecruzamiento por luz ultravioleta han aportado pruebas convincentes de que los 3' UTR de diferentes mRNAs cloroplásticas interactúan con varias proteínas (RNPs). Algunas de ellas parecen unirse indiscriminadamente a diferentes extremos 3' UTR, mientras que otras son específicas para ciertos extremos 3' UTR (Stern y Gruissem, 1989; Gruissem y Schuster, 1993; Albá y Pagés, 1998). El análisis detallado del 3' UTR del mRNA del gen *petD* ha mostrado que dichas proteínas se unen específicamente al precursor, pero no al extremo 3' maduro lo que sugiere que deben estar relacionadas con el procesamiento del extremo 3' UTR (Stern y Gruissem, 1989; Siomi y Dreyfuss, 1998; Albá y Pagés, 1998).

Las RNPs de plantas poseen dos dominios de unión a RNA y una variedad de motivos auxiliares; en particular las RNPs de cloroplasto (**Tabla 1**) tienen una región ácida en el extremo amino terminal. En contraste con los dominios de unión a RNA, la función de los dominios auxiliares sólo se ha establecido en algunos casos y se piensa que pueden influir en la unión a los ácidos nucleicos o a otras proteínas (Kenan *et al.*, 1991; Fukami, *et al.*, 1993; Albá y Pagés, 1998).

### **4. Las RNPs en el procesamiento y estabilización de los mRNAs plastídicos.**

Cuando las 3' IR son eliminadas de los pre-mRNAs, el RNA es rápidamente degradado *in vitro* e *in organelo* (Adams y Stern, 1990; Chen y Stern, 1991). Estas observaciones indican que las 3' IR actúan como elementos para la estabilización de los mRNAs de cloroplastos en plantas superiores y de algas como *Chlamydomonas reinhardtii*. La unión de proteínas al RNA puede alterar su estructura o impedir la interacción positiva o negativa de otras proteínas que actúan en trans al juntar secuencias en RNA que se encuentran distantes o prevenir la formación de estructuras de orden mayor (Portman y Dreyfuss, 1994).

**Tabla 1 RNPs que se han encontrado en cloroplastos de plantas superiores**

Proteína	Especie	Características y función propuesta
<b>Proteínas con dos dominios consenso de unión a RNA</b>		
cp28, cp29A, cp29B, cp31, cp33	<i>Nicotiana sylvestris</i>	unión preferencial a poli(G), poli (U), proteínas de unión generalizada a RNAs presentes como complejos de 20-30S
CP-RNP30, CP-RNP31	<i>N. plumbaginifolia</i>	corresponden a las cp29A y cp29B
cp29, cp31, cp33	<i>Arabidopsis thaliana</i>	homólogos a las de <i>N. sylvestris</i>
RNP-T	<i>Arabidopsis thaliana</i>	
ATRBP31, 33	<i>Arabidopsis thaliana</i>	
cRBP	<i>M. crystallinum</i>	
28RNP	<i>Spinacea oleracea</i>	procesamiento de extremos 3'UTR de mRNAs
24RNP	<i>Spinacea oleracea</i>	desconocida
NBP	<i>Zea mays</i>	aislada como una proteína de unión a DNA
RNP1 de frijol	<i>Phaseolus vulgaris</i>	proteína de unión a AG-1; unión específica a secuencias de DNA de cadena sencilla ricas en T
<b>Otras sin dominios consenso de unión a RNA</b>		
100RNP	<i>S. oleracea</i>	homóloga a la polinucleótido fosforilasa de <i>E. coli</i>
55RNP	<i>S. oleracea</i>	unión específica a regiones ricas en U antes y después de la 3' IR de <i>petD</i>
33RNP	<i>S. oleracea</i>	se une a la 3' IR de <i>petD</i> asociada con la 100RNP
41kDa	<i>S. oleracea</i>	actividad de nucleasa unión específica a la caja II de la 3' UTR de <i>petD</i>
p67	<i>S. oleracea</i>	homóloga a la RNAsa E de <i>E. coli</i>
Endo C1	<i>S. oleracea</i>	endonucleasa sitio específica
Endo C2	<i>S. oleracea</i>	endonucleasa sitio específica
54 kDa	<i>Sinapis alba</i>	endonucleasa unión a las 3' IR de <i>psbA</i> , <i>rps</i> y <i>trnK</i>
RNAsa P	<i>N. tabacum</i>	formación del extremo 5' de los pre-tRNAs

(Tomada de Sugita y Sugiura, 1996)



Los patrones de señalización celular pueden controlar, por ejemplo vía fosforilación los factores que actúan en *trans* durante el procesamiento de RNA. Así, la capacidad de unión a RNA de una proteína puede ser modificada ya sea alterando la afinidad por su molde o cambiando la especificidad de las interacciones proteína-RNA (Albá y Pagés, 1998).

#### **4.1. Empleo de un sistema de procesamiento *in vitro* para el estudio de la generación de los extremos 3' maduros de mRNAs de cloroplasto.**

Se ha diseñado un modelo para el estudio del procesamiento de los extremos 3' *in vitro* a partir de extracto de cloroplastos de espinaca. Este modelo ha sido muy útil para la identificación de RNPs que se unen a extremos 3' por medio de cromatografía de afinidad a RNA y ensayos de entrecruzamiento por luz ultravioleta (Stern y Gruissem, 1989; Schuster y Gruissem, 1991; Hsu-Ching y Stern, 1991; Gruissem y Schuster, 1993, Hayes *et al.*, 1996). Sin embargo, el papel que varias de estas proteínas desempeñan en el procesamiento y estabilización de los mRNAs de cloroplasto queda aún por ser dilucidado.

#### **4.2. Identificación de un complejo de alto peso molecular involucrado en el procesamiento de extremos 3' de mRNAs de cloroplasto.**

Partiendo de un extracto proteico de cloroplastos intactos fue posible aislar, por filtración en gel con Superosa 6 un complejo de alto peso molecular (550 kDa) (Hayes *et al.*, 1996).

En ensayos *in vitro*, se determinó que el complejo de alto peso molecular es necesario pero no suficiente para la formación del extremo 3' maduro y estable. Durante los fraccionamientos que llevaron al aislamiento del mismo, se demostró que para que se prodezca un procesamiento correcto de los extremos 3' se requiere además, de una fracción en la que se encuentran otras RNPs asociadas transitoriamente con el complejo (33RNP, 28RNP y 24RNP) y en cuya ausencia el mRNA es rápidamente degradado.

Formando parte del complejo han sido identificadas hasta el momento las siguientes proteínas: una RNP de 100 kDa, una proteína de 67 kDa, y una de 55 kDa, aunque se sabe que existen otras (Tabla 2).

**Tabla 2 Componentes identificados en el complejo de maduración/degradación de los mRNAs de cloroplasto.**

<b>Peso molecular</b>	<b>Proteína</b>	<b>Homología</b>	<b>Función</b>
100 kDa	100RNP	PNPasa	3'-5'exonucleasa
67 kDa	p67	RNAsa E	endoribonucleasa sitio específica
55 kDa	55RNP		previene el corte de p67 hacia arriba de la estructura tallo-asa
33 kDa	33RNP		desconocida, podría estar modulando la actividad de la 100RNP
28 kDa	28RNP		dirige el correcto procesamiento del extremo 3'
24 kDa	24RNP		desconocida

Por medio de comparaciones de secuencias, se encontró que la proteína de 100 kDa tiene homología con la PNPasa de *E. coli* (McDowall *et al.*, 1995; Hayes *et al.*, 1996). La polinucleótido fosforilasa (PNPasa) de *E. coli* es una exo-ribonucleasa 3'-5' que degrada cualquier RNA a nucleósidos difosfato de una manera procesiva (Littauer y Soreq, 1982). La 100RNP purificada es capaz de degradar totalmente el extremo 3' de *petD*, sólo haciendo una breve pausa en la estructura tallo-asa.

Por otra parte, se sabe que la PNPasa de *E. coli* se encuentra asociada a una endonucleasa: la RNAsa E (Huang *et al.*, 1998; Causton *et al.*, 1994; Miczalc *et al.*, 1996). Utilizando en ensayos de western blot la fracción proteica capaz de unirse a una columna de RNA y anticuerpos contra la RNAsa E de *E. coli*, se obtuvo como banda única a la p67. Ensayos de inmunosustracción del complejo de alto peso molecular con estos mismos anticuerpos, identificaron a la p67 y a la 55RNP unida a ella. Cuando la 55RNP purificada se agregó a un ensayo con p67 y el extremo 3' del gen *petD*, el corte endonucleolítico se

inhibió. Así se dedujo que la p67 es una endoribonucleasa sitio específica que corta los extremos 3' hacia arriba de la estructura tallo-asa. Este corte es inhibido por la 55RNP que se une a motivos ricos en AU arriba de la estructura tallo-asa, lo que permite que la vida media del mensaje se incremente (Hayes *et al.*, 1996).

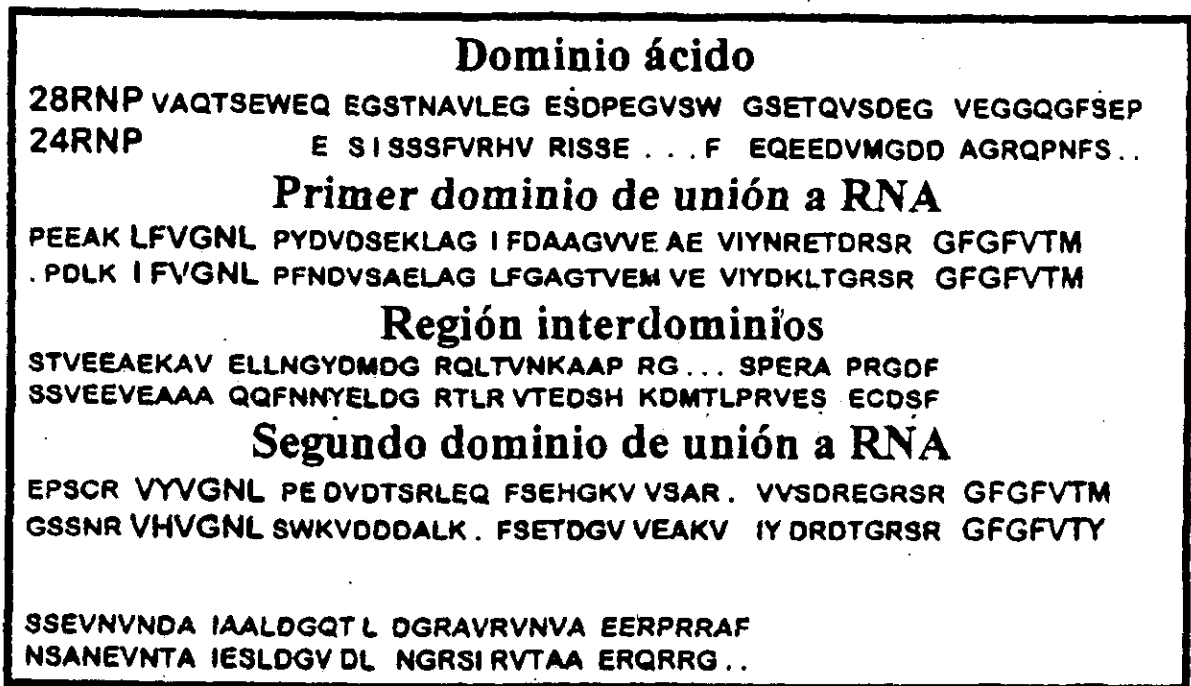
Se contempla la posibilidad de que en ausencia de la 55RNP, p67 inicie el proceso de degradación del mRNA por un corte endonucleolítico arriba de la 3' IR. Un corte a esta altura podría eliminar la estructura tallo-asa y permitir a la 100RNP, que forma parte del complejo, degradar rápidamente al RNA. Cabe mencionar que la mayor parte de la 55 RNP no se mantiene totalmente unida al complejo de alto peso molecular

Otras actividades de endonucleasas que podrían estar participando en la generación de los extremos maduros o en el proceso de degradación de los mensajes han sido identificadas utilizando el extremo 3' UTR del gen *petD*: la Endo C1 (Endonucleasa de cloroplasto 1) la cual corta dentro de la estructura de asa que se forma en el extremo 3' y con ello rompe con su estabilidad; la endo C2 corta al RNA de *petD* en el codón de terminación y en el extremo 3' maduro del mRNA. Este corte puede estar relacionado con un paso inicial hacia la degradación. Lo que resulta interesante es que este corte se encuentra dentro de la zona de unión de otra RNP: la 57RNP. El corte de *petD* en el codón de terminación lleva invariablemente a la degradación del mensaje (Chen y Stern, 1991; Yang *et al.*, 1996).

#### 4.3. Las RNPs pequeñas.

Con excepción de la 28RNP, las funciones que desempeñan la 24RNP y la 33RNP son aún desconocidas

La 24 y la 28RNPs son proteínas codificadas en el núcleo y sintetizadas en el citoplasma, con un péptido de tránsito en su extremo amino terminal que las dirige al cloroplasto, dos dominios consenso de unión a RNA (RNP-CS) y un dominio ácido amino terminal característico de las RNPs de cloroplastos (Schuster y Gruissem, 1991; Abrahamson *et al.*, no publicado) (Figura 2).



**Figura 2. Comparación de las secuencias maduras de aminoácidos de la 24 y 28RNPs**

En ausencia de la fracción donde se localiza la 28RNP, el complejo PNPasa/RNasa E falla en realizar el correcto procesamiento del extremo 3' y el RNA es degradado (Hayes *et al.*, 1996). Por ello, el modelo actual propone que la 24RNP y la 28RNP podrían ser importantes para moderar la actividad de las nucleasas durante el proceso de enverdecimiento, que es cuando se hacen necesarios los altos niveles de mRNAs correctamente procesados (Hayes *et al.*, 1996) (Figura 3).

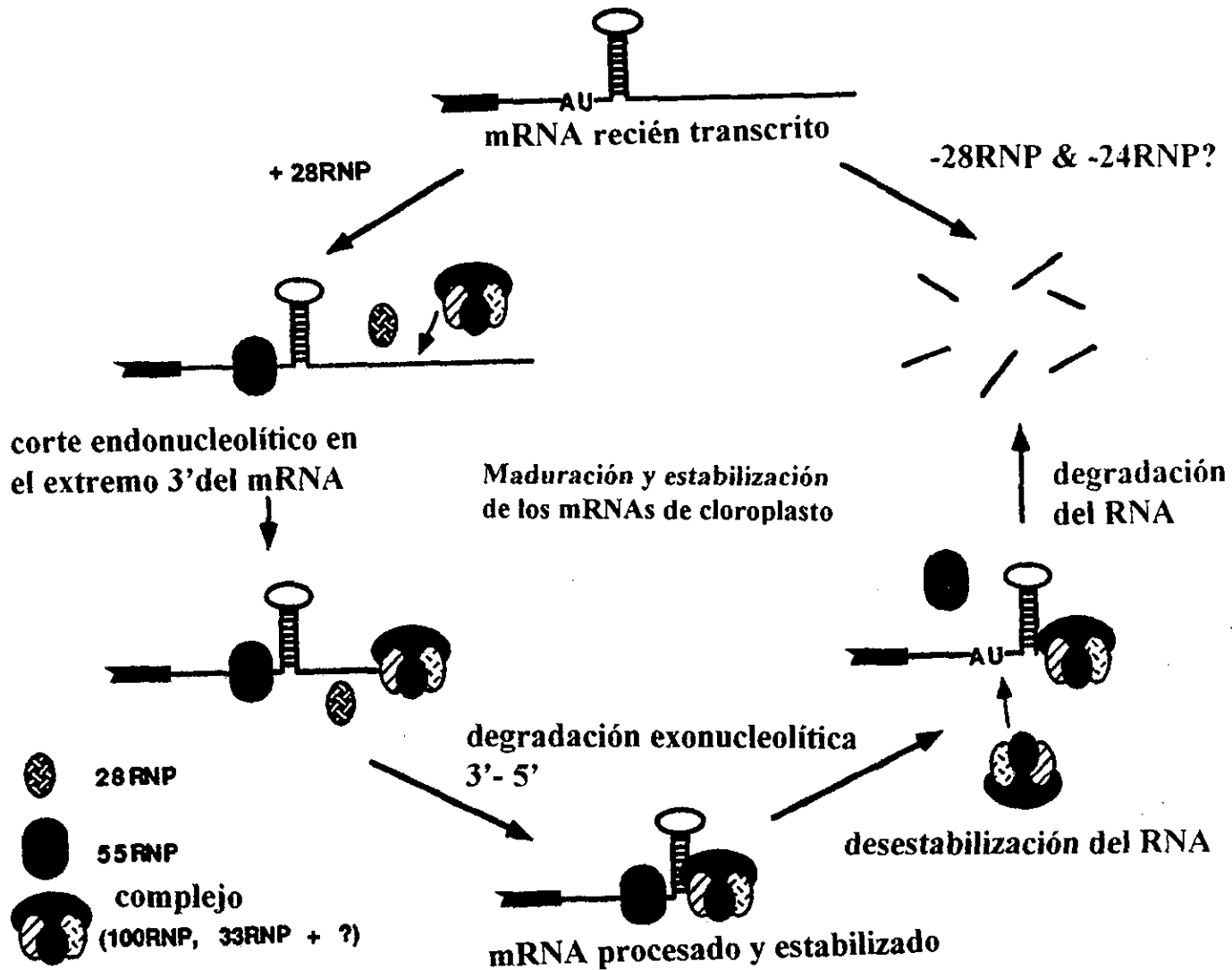


Figura 3. Modelo propuesto para el procesamiento del extremo 3' del mRNA de *petD* de espinaca. En este modelo el mRNA producto de la transcripción es procesado en su extremo 3' por un complejo de alto peso molecular que incluye la 100RNP, p67, otra endonucleasa (?) y la 33RNP para generar en presencia de la 28RNP, un mRNA estable y de menor tamaño que el precursor (tomado de Hayes *et al.*, 1996).

Otras RNPs pequeñas han sido purificadas y sus genes clonados, de *Nicotiana plumbaginifolia* (Li y Sugiura, 1990), *Zea mays* (Cook y Walker, 1992), *Arabidopsis thaliana* (Otha *et al.*, 1995) y tabaco (Li y Sugiura, 1990). La expresión de estas proteínas es regulada por la etapa de desarrollo, es órgano específica y existe también una regulación por luz (Sugita y Sugiura, 1996).

#### 4.3.1. La 33 RNP

Esta proteína pequeña de unión a RNA fue identificada a partir del extracto purificado de cloroplastos de espinaca. En experimentos de co-inmunoprecipitación con anticuerpos anti-100RNP se identificó a la 33RNP como una de las proteínas que interacciona con la 100RNP. La falta de cualquiera de estas dos proteínas, impide que el extracto de procesamiento de espinaca genere los extremos 3' maduros (Hayes *et al.*, 1996).

Actualmente se propone que la 33RNP es la encargada de prevenir o regular la acción de la exonucleasa que se encuentra asociada al complejo y se ha planteado que después del corte inicial endonucleolítico, abajo de la estructura tallo-asa, el complejo degrada el RNA hasta llegar al 3' IR.

#### 4.3.2. La 28RNP

Fue la primera proteína purificada de cloroplastos de espinaca y clonada con base en su co-fraccionamiento con la actividad de procesamiento del extremo 3' de mRNAs de cloroplasto. En experimentos de inmunosustracción con anticuerpos anti-28RNP, se observaron alteraciones en el procesamiento correcto *in vitro* de al menos cuatro diferentes mRNAs (*rbcL*, *psbA*, *pet D* y *rps14*) lo que sugería fuertemente que la 28RNP era esencial para el procesamiento correcto de los extremos 3' *in vitro* (Schuster y Gruissem, 1991).

La 28RNP reconoce motivos estructurales más que secuencias específicas, posee una afinidad mayor por RNAs que contengan IR y no posee actividad de nucleasa (Schuster y Gruissem, 1991; Lisitsky *et al.*, 1995). La 28RNP recombinante de espinaca obtenida en *E. coli*, se une con una afinidad semejante a varias secuencias de RNA: secuencias ricas en U,

estructuras tallo-asa, RNA de transcritos sentido y antisentido 5' ó 3' UTR, regiones codificantes de genes cloroplásticos, sólo mostrando baja afinidad por poli A o poli C. Sin embargo, la proteína cloroplástica nativa no presenta el mismo comportamiento ya que no se une por igual a todos los mensajes de cloroplasto ni a todas las regiones del mensaje, lo que llevó a sugerir que la secuencia de aminoácidos de la 28RNP contiene la afinidad básica por RNA, pero debe ser la interacción con otras proteínas o una modificación post-traducciona que sufre (fosforilación en la Ser-22 que forma parte del dominio ácido de la proteína) lo que confiere la especificidad de unión a RNAs en el cloroplasto (Lisitsky y Schuster, 1995). La 28RNP puede ser fosforilada *in vitro* por una cinasa tipo caseína cinasa II de maíz (Lisitsky y Schuster, 1995; Kaneketsu *et al.*, 1995) y existe en el cloroplasto una actividad de cinasa capaz de fosforilarla (Hayes y Gruissem, resultados no publicados).

Ya que en ausencia de la 28RNP, los extremos 3' no son correctamente procesados se ha propuesto que ésta, por medio de su dominio ácido, puede estar posicionando el complejo de alto peso molecular abajo de la 3' IR para iniciar el corte endonucleolítico y el procesamiento correcto (Hayes *et al.*, 1996).

#### 4.3.3. La 24RNP.

A partir de extractos proteicos fraccionados de hojas de espinaca se prepararon extractos a gran escala para la purificación de proteínas de unión a RNA por columna de DNA de cadena sencilla y HPLC en fase reversa. La 24RNP co-eluye con la 28RNP en las fracciones de 0.3 y 0.4 M de KCl y la fracción que contiene ambas es necesaria para el procesamiento correcto de extremos 3' (Abrahamson *et al.*, no publicado).

La comparación de las secuencias de la 24 y la 28RNP indica que la secuencia de aminoácidos presenta una divergencia considerable en el extremo amino terminal (13% de identidad) en el cual ambas son proteínas ácidas (30% y 27% de aminoácidos ácidos para la 24RNP y la 28RNP respectivamente). A nivel de aminoácidos totales, presentan un 57% de identidad.

El cDNA de la 24RNP que fue originalmente aislado de una biblioteca de cDNA de hoja de espinaca (Abrahamson *et al.*, no publicado) posee colas de poli A, lo que muestra que como la 28RNP, se trata de una proteína codificada en el genoma nuclear.

En plantas de espinaca cultivadas en luz, el nivel del transcrito de la 24RNP es mayor en hojas jóvenes que en hojas maduras y poco abundante en raíz y tallo. El transcrito de la 24RNP se presenta a niveles semejantes en plantas cultivadas en la obscuridad que en raíz, pero ante la exposición a la luz los niveles de transcrito se incrementan después de 24 h, lo que indica que la acumulación del mismo es controlada por luz así como por etapa de desarrollo de la planta y es además es tejido específica (Abrahamson *et al.*, no publicado).

En cuanto a niveles de proteína, la 24RNP es más abundante en extractos de hojas jóvenes de espinaca y decrece en hoja madura, donde la cantidad de 28RNP es mayor.

La capacidad de unión de la 24RNP a diferentes extremos 3' de mRNAs de cloroplasto no es la misma que la de la 28RNP. Existen transcritos a los que la 24RNP se une más fuerte o menos fuerte que la 28RNP y no se sabe aún si la 24RNP sufre modificaciones post-traduccionales semejantes a las de la 28RNP. Sólo se sabe que la cinasa capaz de fosforilar a la 28RNP en el extracto de cloroplastos de espinaca no fosforila a la 24RNP en las mismas condiciones de ensayo (Hayes, datos no publicados).



### III. HIPÓTESIS

Dado que la 24RNP comparte similitudes en secuencia con la 28RNP y que ésta es necesaria para el correcto procesamiento de extremos 3' no traducibles (3' UTR) de mRNAs de cloroplasto, entonces la 24RNP podría también estar involucrada en la definición del sitio correcto de procesamiento de los extremos 3' UTR.

### IV. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Como se mencionó en la revisión de la literatura, es posible el aislamiento de un extracto de procesamiento de extremos 3' de mRNAs a partir de cloroplastos de espinaca. La estrategia que se empleará para demostrar nuestra hipótesis consiste en inmunosubstraer a la 24RNP de un extracto de procesamiento de extremos 3' UTR de cloroplastos de espinaca (EP) empleando para ello anticuerpos contra esa proteína. En el extracto inmuno substraído se analizará la capacidad de procesamiento de extremos 3' de mRNAs tomando como modelo el extremo del gen *petD*. Por otra parte se sobre-expresará en un vector de expresión bacteriano y purificará la 24RNP de espinaca para reconstituir con esta proteína al extracto inmunosubstraído y se analizará nuevamente la capacidad de procesamiento. Considerando que el anticuerpo anti-24RNP reconoce también a la 28RNP se producirá 28RNP de espinaca recombinante para reconstituir también con esta proteína el extracto inmunosubstraído. Ya que se cuenta con un anticuerpo generado contra el dominio ácido de la 28RNP que no presenta reacción cruzada con la 24RNP, en otro experimento de inmunosubstracción, se eliminará la 28RNP del extracto de procesamiento y se realizarán experimentos de reconstitución con la 28RNP recombinante en presencia de la 24RNP. Por medio de la comparación de los resultados obtenidos al inmunosubstraer la 24RNP y la 28RNP o solamente la 28RNP se busca establecer si la 24RNP desempeña un papel semejante al de la 28RNP durante el procesamiento de extremos 3' de mRNAs de cloroplasto.

## V. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Estudiar el papel de la 24RNP en el procesamiento de los mRNAs de cloroplasto a partir de un extracto de procesamiento *in vitro* de cloroplastos de espinaca.

### OBJETIVOS PARTICULARES

1) A partir del gen de la 24RNP de espinaca clonado en el vector pBluescript SK (-) subclonar la región de la proteína madura en el vector de expresión pQE 30 (QIAGEN). La clonación en los vectores de la serie 30 permite el etiquetado de la proteína expresada, con seis histidinas en el extremo amino terminal.

2) Sobre-expresar la 24RNP como proteína recombinante en *E. coli* y purificarla empleando una columna de resina Ni-NTA.

3) Purificar a partir de cloroplastos de espinaca de un extracto proteico con capacidad de procesamiento de mRNAs *in-vitro*.

4) Realizar experimentos de inmunosustracción del extracto de procesamiento de mRNAs de cloroplasto utilizando un anticuerpo generado contra la 24RNP de espinaca

5) Dada la reacción cruzada que el anticuerpo anti-24RNP tiene con la 28RNP y para poder evaluar por separado la función de estas proteínas durante el procesamiento *in-vitro* de mRNAs de cloroplasto, reconstituir el extracto inmunosustraido con la 24RNP recombinante purificada de bacteria, así como con la 28RNP purificada de un sistema eucariote.

6) Para analizar la función independiente de la 24RNP y la 28RNP, inmunosubstraer el extracto de procesamiento con anticuerpos específicos generados contra el dominio ácido de la 28RNP.

7) Evaluar la capacidad procesiva de los extractos inmunosubstraídos en comparación con un extracto control no tratado. Realizar un análisis de los resultados obtenidos en los experimentos de reconstitución, con el propósito de establecer si la 24RNP tiene una función semejante a la de la 28RNP durante el proceso de generación de extremos 3' maduros de mRNAs de cloroplasto.

## **VI. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1. Material biológico**

Para la obtención del extracto de procesamiento de cloroplastos de espinaca, se utilizaron hojas jóvenes de espinaca (de menos de 7 cm de longitud), cultivadas bajo un fotoperíodo de 16 h de luz natural y 8 h de oscuridad a una temperatura de 25°C.

Para los experimentos de infección con el virus PVX, se emplearon plantas jóvenes de *Nicotiana benthamiana* cultivadas en invernadero con un fotoperíodo de 16 h de luz natural y una temperatura de 25 °C y 8 h de oscuridad a 20 °C.

### **2. Clonación de la 24RNP de espinaca sin péptido de tránsito en un sistema de expresión bacteriano.**

La posibilidad de clonar directamente la región codificadora de la 24RNP en pQE fue analizada. Sin embargo, esta región no posee los sitios de restricción adecuados en el extremo 3' para la subclonación. En el extremo 5' la secuencia de la 24RNP posee un sitio PstI que resultó útil y se diseñó un oligo con un sitio BamHI. Para clonar la secuencia de la proteína madura en el vector pQE 30 se empleó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se diseñó el oligo bamsp24+ (que hibrida en el extremo 5' después del péptido de tránsito) cuya secuencia fue: cgcggatccgctccgcattttctcg. Este oligo sirvió de primer para la cadena con sentido, mientras que el oligo M13 universal sirvió como iniciador para la cadena sin sentido.

#### **2.1. Reacciones de amplificación por PCR**

Para las reacciones de PCR el procedimiento seguido fue el que a continuación se describe:

1) En un tubo de microcentrífuga de 0.5 ml se preparó la mezcla de reacción de la siguiente manera: se añadió a cada tubo de reacción 32 µl de agua desionizada estéril, 5 µl de amortiguador de amplificación (200 mM Tris-HCl pH 8.4 y 500 mM KCl), 4 µl de 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 µl de una mezcla de 2.5 mM desoxinucleótidos trifosfato, por cada uno de ellos, 2 µM de oligos forward (bamsp24+) y reverse (M13 universal), 100 ng de DNA

molde (en un volumen de 1  $\mu$ l) y por último una unidad de Taq DNA polimerasa (Gibco BRL). La mezcla se realizó en hielo para evitar apareamiento entre los cebadores.

2) Se mezcló y se agregaron unas gotas de aceite mineral (Sigma M-3516) para evitar la evaporación de la muestra durante los repetidos ciclos de calentamiento y enfriamiento.

3) Se incubó la muestra en el ciclador térmico por 10 min a 94 °C para desnaturalizar completamente el DNA.

4) Cada ciclo de la reacción de amplificación consistió en :

- a) Desnaturalización a 94 °C por un minuto.
- b) Complementación de los iniciadores a 55 °C por un minuto.
- c) Elongación a 72 °C por un minuto treinta segundos.

Se repitió esta serie 30 veces y para la elongación final se incubó por 10 min a 72 °C. finalmente los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % utilizando los marcadores de peso molecular adecuados (100 pb o 1 Kb, Gibco BRL).

## **2.2. Clonación del producto de PCR.**

El procedimiento incluyó las siguientes etapas:

### **a) Generación de células competentes**

Se empleó el método de cloruro de rubidio ( $RbCl_2$ ) que se describe a continuación:

1) A partir de las cepas XL1-Blue, DH5 $\alpha$  y JM 109 se obtuvieron colonias aisladas que se pusieron por separado a crecer en 5 ml de medio A (bacto triptona 2%, extracto de levadura 0.5%,  $MgSO_4$  0.4%, 10 mM KCl pH 7.6) hasta alcanzar una D. O. <sub>550</sub> de 0.3.

2) A 30 ml del medio atemperado a 37 °C se le agregaron 1.5 ml de cultivo de bacterias crecido durante la noche y se dejó con agitación hasta que alcanzó una D.O.<sub>550</sub> de 0.5.

3) Se colocó el matraz en hielo durante 15 min y posteriormente se colectaron las células por centrifugación a 1000xg durante 5 min.

4) Las células se resuspendieron en 8 ml de buffer B (100 mM RbCl<sub>2</sub>, 50 mM MnCl<sub>2</sub> pH 5.8, 30 mM KOAc pH 7.5, 10 mM CaCl<sub>2</sub> pH 5.8) y se incubaron durante 2 h en hielo.

5) Se centrifugó a 1000xg por 5 min y se resuspendió el pellet en 1 ml de solución C (MOPS 10 mM, RbCl<sub>2</sub> 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 75 mM y glicerol pH 7, 15%).

6) Las células se separaron en alícuotas y se congelaron en nitrógeno líquido. Se guardaron a -70 °C y se descongelaron en hielo al momento de uso.

#### **b). Purificación de DNA de gel de agarosa.**

Las purificaciones se realizaron con el kit QIAEX II Agarose Gel Extraction de Qiagen de acuerdo al protocolo del manual.

#### **c) Ligación**

Las reacciones de ligación se efectuaron calculando una relación inserto:vector de 5:1 (se estimaron estas cantidades considerando el tamaño y la intensidad de banda analizados en un gel de agarosa). Se empleó un volumen final de reacción de 10 µl, con buffer de T4 DNA ligasa (Gibco BRL) a 1X ajustando con agua desionizada estéril. La ligación fue llevada a cabo por 8 h a 14 °C.

#### **d) Transformación**

1) Se agrega el DNA con el que se vaya a transformar (si se trata de una miniprep realizada con el kit Qiagen, se utiliza 1µl; si es reacción de ligación se transforma con la mitad de la misma), se incuba por 30 minutos en hielo y luego se coloca a 42 °C durante un minuto y medio e inmediatamente después se le da un cambio térmico a hielo por un minuto y medio.

2) Se le añaden cuatro volúmenes de medio A y se incuba a 37 °C durante 1 hr.

3) Se plaquean las bacterias en medio selectivo.

Para el caso de la transformación de células con el plásmido Bluescript se utilizó medio con 100 µg/ml de ampicilina, para el plásmido pQE además de la ampicilina se seleccionó con 25 µg/ml de kanamicina y en el caso de pCR2.1 se seleccionó en ampicilina, pero además por coloración azul/blanco al plaquear en cajas con X-Gal (50 µg/ml) e IPTG (1mM). Las cajas se incubaron a 37 °C por 18 h y para el mejor desarrollo del color se refrigeraron para poder seleccionar las colonias de coloración blanca.

### 2.3. Obtención de DNA plasmídico

Las extracciones se realizaron con el Kit QIAprep de Qiagen de acuerdo al protocolo del manual. Cada minipreparación se eluyó en 50  $\mu$ l de agua a la que se le ajustó el pH a 9.0 con NaOH.

### 2.4. Secuenciación

La clona de la 24RNP sin el péptido de tránsito en el plásmido bluescript se mandó secuenciar en la Universidad de California en Berkeley.

## 3: Producción y análisis de la 24RNP recombinante de espinaca.

Una vez que se tuvo la 24RNP de espinaca subclonada en el vector de expresión pQE, se procedió a expresar la proteína en *E. coli* y purificarla de acuerdo con los protocolos indicados en el manual de pQE (Qiagen).

### 3.1. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (Laemmli, 1970).

Para preparar el gel de acrilamida al 12% se mezcla:

#### Gel de separación:

H <sub>2</sub> O	1.36 ml
Solución de acrilamida-bisacrilamida	1.6 ml
Buffer de separación (1.5 M Tris-HCl pH 8, SDS 1%)	1 ml
10 % APS	60 $\mu$ l
TEMED	2.5 $\mu$ l

#### Gel de concentración:

H <sub>2</sub> O	1 ml
Buffer de apilamiento (0.5M Tris-HCl pH 6.8, SDS 1%)	444 $\mu$ l
Solución de acrilamida-bisacrilamida	300 $\mu$ l
10 % APS	28 $\mu$ l
TEMED	5 $\mu$ l

### 3.2. Western blot ECL

- 1) Se cortan 20 piezas de papel Whatman 3 MM y una de nitrocelulosa al tamaño del gel que se vaya a transferir y se humedecen en buffer de electro-transferencia (para 1 L: 200 ml de metanol, 2.9 g de glicina, 5.8 g de Trizma base y 0.4 g de SDS).
- 2) Se colocan sobre el electrodo de grafito 10 piezas de papel Whatman húmedas, el gel a transferir, la membrana de nitrocelulosa y 10 piezas más de papel Whatman.
- 3) Se transfiere aplicando  $0.8 \text{ mA/cm}^2$  por 2 h.
- 4) Después de la transferencia se tiñe la membrana de nitrocelulosa con rojo Ponceau-S, se incuba por 5 min y se lava con agua hasta que las bandas sean visibles.
- 5) Se bloquea en TBS( 150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7.4) con 5 % de leche durante 1 hr a temperatura ambiente.
- 6) Se agrega el primer anticuerpo (la dilución utilizada para el anti-24RNP es de 1:3000 y 1:1000 para el anti-28RNP) diluido en TBS con 5 % de leche.
- 7) Se incuba con agitación a temperatura ambiente por 1 hr o toda la noche a  $4^\circ \text{C}$
- 8) Se retira el anticuerpo y se lava la membrana 3 veces por 10 min con TBS.
- 9) Se incuba 1 hr (mínimo) con el segundo anticuerpo (dilución 1:3000) diluido en TBS con 5 % de leche. El segundo anticuerpo esta dirigido contra IgGs de conejo y se encuentra acoplado a la peroxidasa de rábano.
- 10) Después de la incubación se lava 3 veces por 10 min con TBS.
- 11) Se revela con los reactivos de ECL de acuerdo al protocolo.

### 3.3. Inducción de la expresión de la 24 RNP en bacterias.

El sistema QIAexpressionist (QIAGEN) es una manera fácil y rápida para expresar y purificar proteínas recombinantes. Los vectores de expresión pQE dan un alto nivel de expresión en *E. coli* de proteínas que poseen una etiqueta de histidinas que puede ser colocada en el extremo amino (construcciones de tipo IV) o carboxilo (construcciones de tipo III). La purificación de la proteína recombinante se basa en la utilización de la resina Ni-NTA que posee una alta afinidad por la etiqueta de seis histidinas con las que se marca la proteína a purificar.



La subclonación de la 24 RNP en pQE 30 fue de tipo IV, los pasos que se siguen para ello fueron los siguientes:

Después de haber clonado la 24 RNP en el vector pQE 30 (que es el que da el marco de lectura correcto) y verificado la presencia del plásmido en células JM 109, se procedió a transformar células M15 (cepa que posee el plásmido represor pREP4 que mantiene la expresión inhibida hasta que añade IPTG) que es donde se induce la expresión.

Se realizó primero una expresión a pequeña escala, con el propósito de verificar que las bacterias eran capaces de producir la proteína deseada.

### **3.4. Expresión en pequeña escala.**

1) De las transformantes M15 se picaron colonias individuales que se cultivaron por 12 h a 37 °C en medio LB con 100 µg/ ml de ampicilina y 25 µg/ml de kanamicina. Como controles se utilizaron bacterias no transformadas y transformadas con el plásmido pQE sin inserto.

2) Se inocularon 1.5 ml de medio nuevo con antibióticos con 500 µl del cultivo incubado por 12 h y se dejaron crecer las bacterias con agitación constante por 30 min más a 37 °C (la  $A_{600}$  debe llegar a 0.7-0.9 en este período).

3) La inducción se realizó añadiendo IPTG a una concentración final de 2 mM y las bacterias se dejaron crecer por 3 h más.

4) Se colectaron las bacterias por centrifugación a 12,000 rpm por 30s y se resuspendieron en 200 µl de buffer C (8 M urea, 0.1 M fosfato de sodio, 0.01 M Tris-HCl, pH 6.3).

5) Se tomaron 20 µl para realizar la detección de la proteína producida por western blot con anticuerpos anti-24RNP.

### **3.5. Localización sub-celular de la proteína recombinante.**

La técnica empleada es básicamente la descrita en el manual de QIAexpressionist, salvo que se ajustaron algunos volúmenes.

Se cultivaron 10 ml de bacterias durante 12 h y con ellas se inocularon 90 ml de medio de cultivo nuevo con antibióticos.

1) Antes de realizar la inducción con 2 mM de IPTG se tomó 1 ml de muestra (control sin inducir) y se colectaron las bacterias por centrifugación a velocidad máxima por 1 min en una microcentrífuga, se resuspendió en buffer para SDS-PAGE (50  $\mu$ l)

2) Después de haber realizado la inducción con IPTG por 5 h, se tomó una segunda alícuota de 1 ml (control inducido) que se resuspendió también en buffer para SDS-PAGE (50  $\mu$ l).

3) Se dividió el cultivo en dos fracciones de 50 ml, y se colectaron las bacterias por centrifugación a 4000g por 10 min.

#### **a) Verificación de localización citosólica.**

1) Una de las pastillas bacterianas se resuspendió en 5 ml de buffer de sonicación (50 mM de fosfato de sodio pH 7.8 y 300 mM de NaCl).

2) Se congeló la muestra en un baño de EtOH/ hielo seco, y posteriormente se descongeló lentamente en agua fría.

3) Se sonicó brevemente para lisar las células (dos pulsos de 200V con 1 min de sonicación y 1 min en hielo).

4) Se centrifugó a 10,000xg por 20 min. Se decantó el sobrenadante (extracto crudo A, que contiene las proteínas solubles) y se mantuvo en hielo.

5) Se resuspendió la pastilla en 1 ml de buffer de sonicación (extracto crudo B, proteínas insolubles).

#### **b) Verificación de localización periplásmica.**

1) La segunda pastilla se resuspendió en 10 ml de 30 mM Tris-HCl y 20 % de sacarosa pH 8.0.

2) Se agregó EDTA a una concentración de 1 mM y se incubó a temperatura ambiente por 5 min.

3) Se centrifugó en frío a 8000xg por 10 min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 ml de 5 mM  $MgSO_4$  (enfriado en hielo).

4) Se agitó en un baño de hielo por 10 min.

5) Se centrifugó a 8000xg en frío por 10 min. El sobrenadante es el extracto C (fracción periplásmica).

6) Para realizar el análisis, se cargó en un gel de acrilamida dos veces más fracciones B y C que A.

Debido a que en este análisis de localización de la 24RNP se encontró en mayor abundancia en la fracción insoluble (muy probablemente la bacteria al reconocer a la 24RNP como una proteína ajena que se está produciendo en gran cantidad la guarda en cuerpos de inclusión), se probaron diferentes alternativas para optimizar la producción de esta proteína con el objeto de realizar la purificación final a partir de una fracción soluble, sin necesidad de agregar ni detergentes ni agentes desnaturizantes (como la urea) que pudieran afectar el plegamiento de la proteína.

De acuerdo con lo sugerido en el manual de pQE, se variaron condiciones de inducción para tratar de obtener mayor cantidad de proteína soluble. Los parámetros que se modificaron fueron:

Temperatura: se bajó de 37 °C a 35 °C.

Concentración de IPTG: igualmente se disminuyó de 2 mM a 0.5 mM.

Tiempo de inducción: con agitación más lenta se cambió de 5 h a 7 h.

Con estas modificaciones, se logró solubilizar una mayor cantidad de proteína, a pesar de que todavía una buena parte quedó atrapada en cuerpos de inclusión.

### **3.6. Purificación de la 24RNP**

1) Se cultivaron 20 ml de bacterias durante 12 h en medio con antibióticos (Kan/Amp). Con ellos se realizó la inoculación de 1L de medio fresco LB con antibióticos.

(La relación de cultivo de 12 h: medio nuevo debe mantenerse a 1:50).

2) Se dejaron crecer las bacterias hasta que la  $A_{600} = 0.7$ .

3) Se realizó la inducción de la expresión agregando IPTG para lograr una concentración final de 0.5 mM.

4) Se colectaron las bacterias por centrifugación a 4000xg por 20 min y se resuspendieron en 12 ml de buffer de sonicación.

5) Se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a -70 °C para su posterior procesamiento.

6) El descongelado se realizó en un baño de agua con hielo y las bacterias se sonicaron a 200V, con pulsos de 1 min en hielo y 1 min de sonicación. Se sonicó hasta que la  $A_{260}$  alcanzó un máximo.

7) Se agregó RNAsa A a una concentración final de 10 mg/ml y se incubó en hielo por 15 min.

8) El lisado se centrifugó a 10,000xg por 20 min y se colectó el sobrenadante.

9) Se incubó el sobrenadante con 300 mg de resina Ni-NTA (Qiagen) previamente equilibrada en buffer de sonicación y se dejó con agitación por 1 hr a 4 °C.

10) Después de la incubación, se retiró el sobrenadante y se lavó la resina con 8 ml de buffer de lavado (50 mM de fosfato de sodio, 300 mM NaCl, 10% glicerol pH 6).

(Se lavó hasta que se llegó a una  $A_{280}$  menor de 0.01.

11) La proteína se eluyó con un gradiente de imidazol (de 0.1 a 0.6 M), colectando fracciones de 3 ml por concentración de imidazol. Para verificar dónde eluyó la proteína, alícuotas de cada fracción fueron cargadas en un gel de acrilamida al 12 % (20  $\mu$ l de cada fracción).

**NOTA:** con la finalidad de procurar que las modificaciones post-traduccionales que la 24RNP pudiera requerir para su correcto funcionamiento se llevaran a cabo, se diseñó un experimento en el que después de la purificación de la proteína recombinante, ésta se incubó con iluminación en un extracto de cloroplastos recién lisados durante 6 h.y al finalizar el tiempo de incubación se re-purificó por medio de la resina Ni-NTA.

#### **4. Obtención de la 28RNP recombinante.**

Dado que para los experimentos de reconstitución de los extractos inmunosubstraídos se requería de proteína 28RNP de espinaca recombinante funcional, se buscó expresar la proteína en un sistema eucariote de modo que tuviera las modificaciones

post-traduccionales requeridas por esta proteína. Se probaron varios sistemas, siendo el de expresión en plantas de *Nicotiana benthamiana* infectadas con un vector viral donde se subclonó la 28RNP madura el que dio resultados positivos.

#### 4.1. Clonación de la 28RNP en PVX

Los vectores virales se han desarrollado como una alternativa para transferir de manera estable genes a plantas. Estos vectores pueden tener el problema de cierta inestabilidad genética, pero ofrecen ventajas como facilidad de manejo. El virus X de la papa (PVX) es un virus de RNA de cadena sencilla que se encuentra poliadenilado en el extremo 3'. La secuencia completa de su genoma se conoce y el vector viral posee la ventaja sobre virus de DNA de ser capaz de transportar insertos de mayor tamaño dando altos niveles de expresión sistémica (Champman *et al.*, 1992).

Para clonar en este vector viral la 28RNP de espinaca se siguió el protocolo que se detalla a continuación:

1) A partir de la clona de la 28RNP en el vector de expresión bacteriano pQE-31 amablemente proporcionado por el Dr. Gadi Schuster del Technion-Israel Institute of Technology se realizó una minipreparación con el kit de Qiagen (se obtuvieron 50 µl de una concentración aproximada de 1 µg/ µl). El inserto con todo y la etiqueta de seis histidinas se sacó a partir de 25 µg de DNA, cortando con las enzimas Eco RI y Hind III. La digestión se dejó por 3 h a 37 °C y el tamaño del fragmento de 886 pb se verificó por electroforesis en gel de agarosa.

2) Al resto del ensayo de restricción (20 µl), se le añadieron 1 µl de dNTPs 10 mM y 4 µl de fragmento Klenow de la DNA polimerasa (NEB) para rellenar y se incubó la reacción por 1hr a temperatura ambiente.

3) El DNA se corrió en un gel de agarosa y la banda se purificó empleando el kit para purificación a partir de gel de agarosa de Qiagen. Se eluyó en 20 µl de agua libre de RNAsas y se verificó la recuperación del DNA corriendo 5 µl del eluido en un gel de agarosa al 1%.

4) La banda purificada se utilizó para montar la reacción de ligación con el vector PVX (utilizando como control de ligación el vector cortado y re-ligado). El vector se cortó con Eco RV y con una relación vector: inserto de 1:6, se montó la reacción de ligación en 10  $\mu$ l utilizando 1  $\mu$ l de T4 DNA ligasa. Se incubó a 16 °C durante toda la noche.

5) Tomando 1/5 de la reacción de ligación (2  $\mu$ l) se transformaron células DH5  $\alpha$ . Se plaqueó en cajas con ampicilina 100  $\mu$ g / $\mu$ l. Las cajas se incubaron a 37 °C por 15 h.

6) De las colonias obtenidas en placa, se realizó un PCR con los oligos PVX1 (forward) y PVX2 (reverse) para verificar la presencia del inserto.

7) Las colonias positivas por PCR, se pusieron a crecer en medio líquido LB con ampicilina (100  $\mu$ g / $\mu$ l) y se obtuvo el DNA plasmídico. Debido a que el tamaño del vector es grande, se utilizó el kit de Qiagen, pero no se pasó por las columnas, sino que se precipitó el DNA con isopropanol incubando a -20 °C por 10 min y luego se lavó dos veces con EtOH al 70%.

8) Para saber si la orientación de la clona era la correcta se digirió con PstI, obteniéndose los fragmentos esperados de 86 pb y 800 pb. Además se realizó una reacción de PCR con los oligos 28 Forward-PVX1 y 28 Forward-PVX2, obteniéndose solamente banda en este último lo que indicó también que la orientación del inserto era la correcta.

9) El resto del DNA precipitado se cortó con SpeI verificándose en un gel de agarosa la linearización del fragmento corriendo 1/10 del ensayo de restricción.

El DNA linearizado se trató con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), se precipitó nuevamente con isopropanol y se lavó con EtOH al 70 %. Se eluyó en 10  $\mu$ l de agua estéril.

10) Con 1/5 del DNA obtenido se montó la reacción de transcripción *in vitro*. El ensayo se realizó en un volumen de 50  $\mu$ l utilizando 2  $\mu$ l de T7 RNA pol, 0.5  $\mu$ l de RNAsin, 10 mM de Cap, una mezcla de ribonucleótidos (A, C, U 5 mM; G 1.5 mM) y buffer para la T7 pol 1X. La mezcla de reacción se incubó a 37 °C por 3 h. Se tomó 1/10 de la reacción para verificar la eficiencia de obtención del producto, corriendo un gel de agarosa al 1%.

#### **4.2. Infección de las plantas de *Nicotiana benthamiana* con el virus PVX.**

Del transcrito obtenido se tomaron 5 y 10  $\mu$ l y se mezclaron con 30  $\mu$ l de bentonita. Con la mezcla se inocularon plantas de *Nicotiana benthamiana* produciendo pequeñas heridas en las tres hojas más desarrolladas de la planta

#### **4.3. Fraccionamiento celular de tejido de hoja para purificación de la 28RNP de plantas de *Nicotiana benthamiana***

1) El tejido de hoja infectada se congeló en nitrógeno líquido y se trituró en un mortero con buffer BEP(400 mM sacarosa, 100 mM Tris pH 7.4, 10 mM KCl, 5 mM  $MgCl_2$ , 10 % glicerol, 10 mM  $\beta$ -mercaptoetanol y 1 mM PMSF). Se utilizan 4 ml de buffer por cada gramo de tejido.

2) Se centrifugó a 5000 rpm por 10 min.

3) Se tomó el sobrenadante (fracción soluble) y el pellet se resuspendió en BEP. El pellet contiene fracciones membranales que, de encontrarse la proteína de interés asociada a ellas, se puede tratar con 1M de LiCl en BEP incubando en hielo por 30 min y centrifugando nuevamente a 5000 rpm por 10 min.

4) Se verificó la localización de la proteína de interés por western blot cargando tres veces más fracción soluble que fracción membranal.

#### **5. Análisis de la actividad de procesamiento *in vitro* de extremos 3' de mRNAs de cloroplasto.**

Estos experimentos incluyeron la purificación, a partir de cloroplastos de hojas jóvenes de espinaca, de un extracto de procesamiento capaz de generar extremos 3' maduros de mRNAs de cloroplasto. El análisis de la actividad de procesamiento se realizó incubando precursores marcados radiactivamente y observando la aparición de un producto estable de menor tamaño que el precursor.

### 5.1. Electroforesis de RNA en geles desnaturalizantes de acrilamida

1) Se preparó un gel de poliacrilamida al 6% mezclando:

4 ml solución 0.5 X TBE, 15 % acrilamida, 0.75 % bisacrilamida, 7 M urea

8 ml solución 0.5 X TBE, 7 M urea

55  $\mu$ l APS 20 %

8  $\mu$ l TEMED

2) Se pre-corió el gel a 25 mA hasta que la temperatura de los vidrios fue de 50 °C

Se cargaron en el gel las muestras de RNA y se corrió el gel a 20 mA hasta que el azul de bromofenol empezó a salir del gel.

3) Cuidadosamente se separaron las placas de vidrio, se transfirió a papel Whatman 3 MM y se cubrió con saran wrap.

4) Se secó el gel y se expuso una película de rayos X por 6-10 h usando una pantalla intensificadora.

### 5.2. Obtención de un extracto con actividad de procesamiento de extremos 3' de mRNAs de cloroplasto.

1) La noche anterior al experimento se prepararon y se guardaron a 4°C los siguientes reactivos:

a) Buffer 1 X GR

b) PCBF

c) Buffers A y B

d) Buffer para cromatografía en DE 52

e) Buffer E

f) 10 g de resina DE-52 incubada en buffer DE 52.

2) Se cosecharon las espinacas por la mañana (de 500 g a 1 kg de hojas de menos de 7 cm de longitud). Se lavaron con agua fría y se colocaron en el cuarto frío.

3) Porciones de 60 g se licuaron con aproximadamente 150 ml de buffer 1X GR. Se dieron pulsos cortos hasta que se vio que el tejido estaba bien homogenizado y luego se dio un pulso largo a mayor velocidad.

4) Se filtró el homogenado por 4 capas de gasa utilizando un vaso de precipitado de 1 L estéril para coleccionar el filtrado. Se exprimió la gasa para coleccionar todo el líquido posible cuidando de no dejar pasar los restos de tejido.



5) El filtrado se centrifugó en frío a 6000 rpm en un rotor JA20 por 5 min en porciones de 50 ml aproximadamente.

6) Se resuspendió el pellet de cloroplastos con un pincel en un total de 24 ml de buffer 1 X GR (incuyendo el buffer utilizado para limpiar los tubos donde se centrifugó).

7) Se construyeron gradientes discontinuos empleando 5 ml de Percoll al 80 % y 12 ml de percoll al 40 % en tubos estériles para centrifuga (de 50 ml). (NOTA: es preferible no preparar los gradientes con más de 1h de anticipación).

8) Se cargaron en cada gradiente 6 ml del pellet de cloroplastos resuspendidos. Se cuidó de no alterar la superficie del gradiente. Se centrifugó en un rotor JA20 a 7000 rpm por 20 minutos en frío. Es importante cuidar que la centrifuga tenga el freno apagado, de modo que el rotor pare de manera muy lenta sin romper el gradiente.

Después de la centrifugación, se forman por lo general 2 bandas de cloroplastos, la inferior es la que contiene los cloroplastos intactos que se recolectan con una pipeta pasteur.

9) Se obtuvieron aproximadamente 15-20 ml de cloroplastos intactos. Éstos se colocaron en otro tubo estéril. Se lavó llenando el tubo con buffer 1X GR y se centrifugó a 6000 rpm por 2 min a 4 °C. Se aspiró el buffer con una pipeta pasteur estéril.

10) Se resuspendieron los cloroplastos en 6 ml de buffer A, se colocaron en un homogenizador de vidrio manual, se lisaron y se dejaron reposar 5 min en hielo. La mezcla se transfirió a un vaso de precipitado estéril de 50 ml y se agregaron 7 ml de buffer B y una barra magnética para agitar. A esta preparación se le agregó gota a gota 2.5 ml de una solución saturada de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y la mezcla se dejó agitando por 30 min a 4 °C.

11) Se centrifugó por 2 h a 50,000 rpm en una ultracentrífuga sin freno.

12) La resina DE 52 incubada en buffer de cromatografía se resuspendió y se colocó en una columna de 5 ml a temperatura ambiente. Ya empacada la columna se lavó con 30 ml de buffer de cromatografía.

13) El sobrenadante del paso 11 se aplicó a la columna y se colectó el filtrado después del primer ml.

14) Las proteínas se precipitaron añadiendo poco a poco  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  finamente molido (0.28 mg/ml de muestra). Se agitó por 30 min a 4 °C o hasta que el  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  se disolvió completamente.

15) Se centrifugó la muestra en un rotor de columpio a 25,000 rpm en el rotor SW 40Ti y se resuspendió el pellet en 800 µl de buffer E. El tubo se limpió con otros 200 µl de buffer para tener la muestra en 1 ml.

16) Se dializó por 13 h contra 1L de buffer E. Se cambió el buffer y se dializó por 3 h más.

17) Se sacó la muestra de la bolsa de diálisis, se centrifugó en un tubo de microcentrífuga para remover proteínas precipitadas. Se hicieron alícuotas (fracciones de 50 µl) en tubos de microcentrífuga estériles y se guardó a -70 °C.

Buffers empleados en la técnica:

5 X GR      5 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> · 10 H<sub>2</sub>O (disuelto en 40 ml de agua hirviendo)  
40 mM HEPES  
1.65 M de Sorbitol  
10 mM EDTA  
5 mM MgCl<sub>2</sub>  
5 mM MnCl<sub>2</sub>  
H<sub>2</sub>O (para ajustar volumen)

1X GR      Buffer 5X GR  
H<sub>2</sub>O estéril para diluir  
10 mM DTT

PCBF      100 ml Percoll  
3 g PEG 8000  
1 g BSA  
1 g Ficoll

Soluciones para gradientes

	40 %	80%
5 X GR	20 ml	20 ml
glutación reducido	6 mg	6 mg
PCBF	40 ml	80 ml
1M DTT	1 ml	1 ml
H <sub>2</sub> O estéril	40 ml	

Buffer A      10 mM Tris pH 7.9  
1 mM EDTA  
5 mM DTT

Buffer B	50 mM Tris pH 7.9 10 mM MgCl <sub>2</sub> 2 mM DTT 25 % Sacarosa 50 % v/v glicerol
Buffer para DE-52	25 mM Tris pH 7.9 0.4 mM EDTA 2.8 mM DTT 4.2 mM MgCl <sub>2</sub> 10 % Sacarosa 20 % Glicerol 0.5 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Buffer E	20 mM HEPES pH 7.9 60 mM KCl 12.5 mM MgCl <sub>2</sub> 2 mM DTT 17 % Glicerol

### 5.3. Transcripción *in vitro* de RNAs para experimentos de procesamiento *in vitro* y entrecruzamiento de proteínas con RNA por luz ultravioleta.

La técnica empleada fue la descrita por Gruissem y Schuster, 1989.

1) El plásmido donde se tiene clonado el extremo 3' UTR del gen *petD* se cortó con la enzima Xba I y se preparó una dilución del plásmido a una concentración de 1 µg/µl .

2) En un tubo de microcentrifuga se combinó:

1 µl de DNA (1 µg)

2 µl de buffer de la T7 RNA pol 10 X

0.5 µl de 40 mM DTT

2 µl de rNTPs (para RNA-H una concentración 10 X = 5 mM rG, rC, rA; 0.25 mM rU. 5mM rG, rC, rA sin rU para RNA-X. El RNA-H se emplea en procesamiento *in vitro* y el RNA-X en experimentos de entrecruzamiento por luz ultravioleta)

9 µl de H<sub>2</sub>O libre de RNAsas

3) Se añadió 1 µl de α<sup>32</sup>P -UTP (20 µCi/ µl, 8000 Ci/ mmol)

4) Se agregó 1 µl (10 U/µl) de T7 RNA polimerasa y se incubó a 37 °C por 1hr.

5) Se añadieron 15 µl de NH<sub>4</sub>OAc 5M y 100 µl de EtOH absoluto.

- 6) Se precipitó a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 10 min y se centrifugó a 12000 rpm por 15 min en frío.
- 8) Se retiró el EtOH y se dejó secar antes de agregar 7  $\mu\text{l}$  de buffer de formamida (formamida desionizada más 0.1% de xilencianol y azul de bromofenol).
- 9) Se hirvió la muestra por 5 min y se corrió en un gel desnaturalizante de acrilamida-urea 7M al 6 % en TBE 0.5 X
- 10) Se expuso el gel cubierto con saran wrap a una película de rayos X por 5 seg la cual se reveló. Por medio de la película se identificó la banda correspondiente al RNA sintetizado.
- 11) Se cortó la banda del gel que contenía el transcrito marcado y se colocó en un tubo de microcentrífuga
- 12) Se agregaron al tubo: 180  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  tratada con DEPC  
20  $\mu\text{l}$  de 5M NaOAc pH 5.5  
1  $\mu\text{l}$  de 250 mM EDTA  
1  $\mu\text{l}$  de SDS al 20 %
- 13) Se incubó a  $4^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche. Después se retiró el buffer de elución y se agregan 500  $\mu\text{l}$  de EtOH. Se precipitó por 1 hr a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- 14) Se centrifugó en una microfuga a 12000 rpm por 10 min en frío, se retiró el etanol y se dejó secar el pellet al vacío. Se resuspendió en 20  $\mu\text{l}$  de agua y se contó una pequeña alícuota (0.5  $\mu\text{l}$ ) en el contador de centelleo.

NOTA: el molde que se utilizó fue el del extremo 3' del gen *petD*. Este gen codifica la subunidad IV del complejo tilacoidal citocromo  $b_6/f$ . El RNA precursor es de 267 nt de longitud, incluyendo 70 nt de la región codificante y 58 nt del IR 3' y el producto procesado estable es de 209 nt.

#### 5.4. Procesamiento *in vitro* de extremos 3' de mRNAs de cloroplasto.

El uso de extractos proteicos crudos o parcialmente fraccionados ha sido importante en el análisis de los factores que regulan la transcripción y el procesamiento de RNA. En plantas, extractos de cloroplasto parcialmente fraccionados se utilizaron inicialmente para establecer la estructura de las regiones promotoras (Gruissem *et al.*, 1989) y el

procesamiento de mRNAs de cloroplasto. En los experimentos de procesamiento de mRNAs *in vitro*, un precursor marcado radiactivamente que contiene regiones codificadoras 3', secuencias invertidas repetidas (IR) de la región no codificante 3' y secuencias 3' adicionales que no forman parte del mRNA maduro, se incuban con un extracto cloroplástico parcialmente purificado (Gruissem, *et al.*, 1986). Después de la incubación, los RNAs se purifican y el procesamiento del precursor a una forma madura se analiza por electroforesis en gel de acrilamida y autoradiografía (Stern y Gruissem, 1987).

El procedimiento para la realización del experimento se describe a continuación (Schuster y Gruissem, 1989).

1) En un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml se mezclan:

Buffer de IVT 20X	0.5 $\mu$ l
Extracto proteico (20 $\mu$ g)	L
Buffer E	M (L+M = 5 $\mu$ l)
H- RNA (2000 cpm)	X
H <sub>2</sub> O	Y (X+Y = 4.5 $\mu$ l)

Volumen final de reacción = 10  $\mu$ l

Concentraciones finales: HEPES pH 7.9 10 mM

KCl 40 mM

MgCl<sub>2</sub> 10 mM

EDTA 0.05 mM

DTT 3 mM

Glicerol 8.5 %

**Buffer E:** 20 mM HEPES pH 7.9, 60 mM KCl, 12.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA, 2 mM DTT y 17 % glicerol.

**Buffer IVT 20 X:** 75 mM MgCl<sub>2</sub>, 40 mM DTT y 200 mM KCl.

Se recomienda preparar una mezcla de reacción con todos los componentes menos el extracto protéico.

2) La reacción se inició adicionando al RNA el extracto proteico, se mezcló con agitación en el vortex y se centrifugó brevemente en la microcentrífuga. Esta mezcla se incubó a 25 °C por 60 min (o a diferentes tiempos de 0-60 min, cuando se realizaron cinéticas).

Nota: se incluyó siempre un control al que no se le agregó el extracto protéico.

3) Se detuvo la reacción tomando 5 µl de la mezcla de reacción y mezclándolos con 45 µl de solución de parado de reacción (urea 6M, SDS 1% y ATA 4.5 mM), se vortexó brevemente y mantuvo en hielo.

4) Se agregaron 50 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló agitando con el vortex y se centrifugó por 2 min a temperatura ambiente. Se tomó con una pipeta la fase acuosa (roja superior) y se pasó a un tubo nuevo.

5) Se añadió al nuevo tubo 1 µl de 3M NaOAc pH 5.5, 1 µl de tRNA (10 mg/ml) y 125 µl de EtOH absoluto frío. Se incubó por 20 min a -20 °C y después se centrifugó por 15 min a 4 °C.

6) Con cuidado se retiró el etanol, se secó el pellet y se resuspendió en 7 µl de solución de formamida.

7) Antes de cargar el gel, se hirvieron las muestras en un baño de agua por 3 min. En seguida se pasaron a un recipiente con hielo mientras se cargaba el gel.

### **5.5. Ensayos de entrecruzamiento por luz ultravioleta de proteínas a RNA.**

Existen varias técnicas que permiten la detección de interacciones ácidos nucleicos-proteínas. Entre ellas el entrecruzamiento de proteína a RNA por medio de luz ultravioleta es un método relativamente sencillo (comparado con ensayos de retardo de movilidad en gel o de foot printing con DNAsa I) que puede ayudar a estimar el tamaño de las proteínas que se unen a ácidos nucleicos en un extracto proteico. En este ensayo, las proteínas son marcadas indirectamente por la transferencia de radictividad de los ácidos nucleicos a la proteína. La irradiación de la mezcla ácidos nucleicos-proteínas con luz ultravioleta produce radicales de purinas y pirimidinas. Un enlace covalente puede formarse entre esos radicales y un aminoácido cercano (en los sitios de contacto ácido nucleico-proteína) como cisteína,

serina, metionina, lisina, arginina, histidina, triptofano, fenilalanina y tirosina. Después de la irradiación, el DNA o RNA sin protección es digerido por nucleasas y las proteínas analizadas por SDS-PAGE y autoradiografía. La especificidad de la unión proteína-ácido nucleico puede determinarse por experimentos de competencia con un exceso de competidor como poli dC o RNA no marcado.

Para estos experimentos se utilizó, el mismo extremo 3' de mRNA que en los experimentos de procesamiento *in vitro*, salvo que se transcribe con una alta actividad específica de  $\alpha$  <sup>32</sup>P-UTP y se purifica como X-RNA.

Condiciones generales de reacción:

1) En un tubo de microcentrífuga se mezcló:

Buffer IVT 20 X	0.75 $\mu$ l
Extracto proteico de cloroplastos (20 $\mu$ g)	L
Buffer E	M (L+M = 7.5 $\mu$ l)
X-RNA (100,000 cpm)	X
H <sub>2</sub> O	Y (X+Y = 6.5 $\mu$ l)
40 mM DTT	1 $\mu$ l

Se agregaron primero todos los reactivos excepto el X-RNA, se incubó a temperatura ambiente 5 min, se mezcló y se centrifugó brevemente. Se adicionó el X-RNA y se incubó por 10 min.

2) Se colocó en el Stratilinker que se operó en modo energía a 1.8 Joules (2 veces 9000 en la escala).

3) Se adicionó 1  $\mu$ l de RNAsa A (1  $\mu$ g/ $\mu$ l) y se incubó por 20 min a 37 °C.

4) Se agregaron 4  $\mu$ l de buffer 5X de carga (Laemmli), para proteínas se calentaron las muestras a 100 °C por 3 min y se cargaron en un gel desnaturizante para proteínas.

## **6. Inmunosubstracción de extractos de procesamiento de RNA de cloroplastos de espinaca.**

### **6.1. Inmunoprecipitación por acoplamiento del anticuerpo a proteína A.**

Las columnas de proteína A-anticuerpo son de las más versátiles y fáciles de preparar pues el anticuerpo se une a la matriz vía el dominio Fc y el sitio de unión del antígeno se encuentra orientado correctamente para una máxima interacción.

Los anticuerpos una vez unidos a la proteína A se entrecruzan covalentemente por medio de un reactivo bifuncional como el dimetilpimelidato (DMP) que se une a grupos amino libres.

Ya que la proteína A tiene diferentes afinidades por distintos anticuerpos puede haber ocasiones en que no sea posible acoplar grandes concentraciones de anticuerpo.

La técnica empleada fue la descrita por Harlow y Lane, 1988.

1) Para unir el anticuerpo a la proteína A, éstos se mezclaron y se incubaron a temperatura ambiente por 1hr (o toda la noche a 4 °C) con agitación. Es mejor no utilizar una columna ya que así se genera un gradiente de concentración de anticuerpo. Por lo general se recomienda unir 2 mg de anticuerpo por ml de proteína A hidratada, pero si la afinidad del anticuerpo es baja se tendrán que utilizar cantidades mayores de anticuerpo (En el caso de la conjugación del anticuerpo anti-28RNP no fue necesario incrementar su cantidad).

2) Se lavó dos veces con 10 volúmenes de 200 mM borato de sodio pH 9.0 y se centrifugó a 3000xg por 5 min.

3) Se resuspendió en 10 volúmenes de 200 mM borato de sodio, pH 9.0. Se tomaron 10 µl de muestra y se agregó el DMP (sólido) a una concentración final de 20 mM.

4) Se mezcló con agitación por 30 min a temperatura ambiente (se tomó una nueva muestra de 10 µl).

5) Se detuvo la reacción lavando con un volumen de 200 mM etanolamina, pH 8.0.

6) Se incubó con agitación constante con la etanolamina por 2 h a temperatura ambiente.



7) Se resuspendió en PBS con 0.1 % de mertiolate.

8) Se verificó la eficiencia del acoplamiento hirviendo las muestras tomadas antes y después de agregar el DMP. Se corrió en un gel de acrilamida para proteínas cargando 1 y 9  $\mu$ l de la muestra.

Un buen acoplamiento se nota por bandas de alto peso molecular (550 kDa) antes, pero no después del acoplamiento.

Se utilizaron en los experimentos de inmunosustracción 1 mg de proteína total en extracto de espinaca (100  $\mu$ l del extracto de procesamiento de hojas jóvenes de espinaca) y 2 mg de anticuerpo

## **6.2. Purificación de anticuerpos por afinidad con el antígeno.**

El método más utilizado para purificar anticuerpos específicos a partir de una preparación de anticuerpos policlonales es por inmunoadfinidad. En este procedimiento, el antígeno purificado se une covalentemente a un soporte sólido y los anticuerpos que son específicos contra ese antígeno se unen a él. Los anticuerpos que no se unen se lavan y los que interaccionan específicamente se eluyen (Harlow y Lane, 1988).

1) Como soporte se utilizó agarosa activada a la que se le agregó el buffer de unión (20 mM fosfato de sodio pH 7.0). Se agregó 1 mg de proteína purificada (24RNP o 28RNP recombinantes según el caso) y se incubó por 30 min a temperatura ambiente con agitación constante.

2) Se tomó el sobrenadante y para confirmar que el acoplamiento se llevó a cabo se midió concentración de proteína.

3) Se lavó la columna con 10 volúmenes de 10 mM Tris-HCl pH 7.5 y después con 10 volúmenes de 100 mM glicina pH 2.5, seguido de otro lavado con 10 volúmenes de 10 mM Tris-base pH 8.8 (hay que verificar el pH de la fracción eluida, si no es de 8.8, se debe seguir lavando con Tris).

5) Se lavó después con 10 volúmenes de 100 mM trietilamina pH 11.5 recién preparada y 10 volúmenes de 10 mM Tris pH 7.5 (o hasta que el pH de la fracción eluida sea de 7.5).

6) Se agregó la fracción del anticuerpo (2 mg) diluido 1:10 en 10 mM de Tris-HCl pH 7.5. Se incubó con agitación por 30 min a temperatura ambiente.

7) Se tomó el sobrenadante y se lavó con 20 volúmenes de 10 mM Tris pH 7.5 y finalmente con 10 volúmenes de 10 mM Tris pH 7.5 y 500 mM NaCl.

8) Se eluyeron los anticuerpos pasando 10 volúmenes de 100 mM glicina pH 2.5 (se colectó el sobrenadante en un tubo que contenía un volumen de Tris 1M pH 8.0).

9) Se lavó nuevamente con 10 mM Tris-base pH 8.8 hasta que el pH llegó a 8.8.

10) Se agregaron 10 volúmenes de 100 mM Trietilamina pH 11.5 y se colectó la fracción eluída en un tubo con un volumen de 1 M Tris pH 8.0.

11) Se lavó la columna con 10 mM Tris pH 7.5 hasta que se alcanzó ese pH.

12) Las fracciones colectadas de anticuerpo se mezclaron y se dializaron contra PBS con 0.02% de azida de sodio.

## VII. RESULTADOS

### 1. Clonación de la 24RNP en el vector de expresión bacteriano pQE-30.

El cDNA completo de la 24RNP de espinaca aislado por escrutinio de una biblioteca de cDNA de hoja de espinaca, fue clonado en el vector pBluescript SK (+) (Abrahamson *et al.*, no publicado). Para los estudios propuestos en este trabajo, el primer objetivo fue subclonar el fragmento del gen correspondiente a la proteína madura (sin el péptido de tránsito) en un vector de expresión bacteriano. El sistema a utilizar fue el QIA Expressionist (Qiagen), diseñado para la expresión y purificación de proteínas recombinantes. Los vectores pQE producen un alto nivel de expresión en *E. coli*, de proteínas que contienen una etiqueta de seis histidinas en uno de los extremos de la proteína producida, lo que facilita su purificación. En este caso, el gen de la 24RNP se subclonó en el vector pQE-30, el cual permitió el etiquetado de la proteína en el extremo amino terminal y la introducción del mensaje en fase. Esta construcción se utilizó para transformar una cepa de *E. coli* que contiene varias copias del plásmido represor pREP4 que porta el gen *lacI*, el cual codifica el represor *lac*. Los altos niveles del represor *lac* aseguran la regulación controlada de la expresión de la proteína recombinante. Para subclonar la 24RNP madura, se realizaron reacciones de amplificación por PCR con el oligo bamsp 24+ (forward) y el M13 Universal (reverse) y cDNA de la 24RNP como molde (sección 6.2.1. de materiales y métodos).

Una vez obtenido el producto de PCR, se verificó su tamaño (1.2 Kb) por electroforesis en gel de agarosa. Debido a que la polimerasa pudo haber cambiado la secuencia de bases del fragmento durante los ciclos de amplificación, fue necesario secuenciar el producto de PCR. Con este propósito primeramente se subclonó el fragmento de 1.2 Kb en el plásmido Bluescript.

Para montar la reacción de ligación correspondiente, el producto de PCR y el vector se digirieron con *Bam HI* y *Pst I*.

La secuenciación comprobó que no hubo cambios en la secuencia de la 24RNP que codifica la proteína madura. Una vez hecho esto se efectuó la subclonación en el vector pQE-30 digiriendo el fragmento con *BamHI* y *Pst I* y se transformaron células JM109. Entre

las observaciones realizadas en esta etapa estuvo el hecho de que las colonias transformadas tardan más de lo normal en crecer y el número de transformantes obtenidas es bajo.

Algunas de las colonias resistentes a ampicilina se cultivaron en medio líquido para obtener plásmido verificándose la presencia del inserto por digestión con *Bam HI* y *Hind III*. Al menos una colonia de las ensayadas tuvo el inserto por lo que se procedió a transformar con este plásmido a la cepa M15 que es donde se puede inducir la expresión de la proteína recombinante.

## **2. Obtención de la proteína 24RNP recombinante.**

Los primeros experimentos de inducción con IPTG de la expresión de la 24RNP madura clonada en pQE se hicieron a pequeña escala. Con estos cultivos se prepararon extractos bacterianos totales en buffer de 8M de urea, para análisis por SDS-PAGE.

Además de las colonias positivas inducidas con IPTG se analizaron los siguientes controles:

Control 1: células M15 no inducidas con IPTG, sin pQE.

Control 2: células M15 inducidas con IPTG y sin pQE.

Control 3: células M15 con pQE, sin inserto, sin inducir con IPTG.

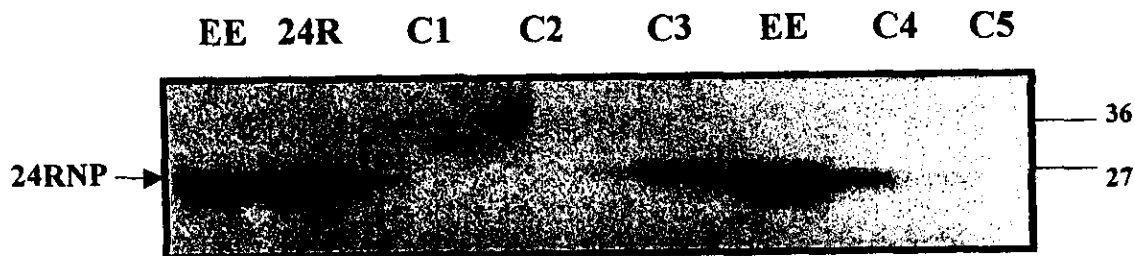
Control 4: células M15 con el plásmido pQE, sin inserto, inducidas con 2mM de IPTG.

Control 5: células M15 con pQE-24RNP (con inserto), no inducida con IPTG.

Control 6: Extracto total de hojas jóvenes de espinaca.

El control 6 fue importante para corroborar la detección de la 24RNP por el anticuerpo. Previamente se habían realizado experimentos para establecer que la dilución a la que el anticuerpo reconocía a la proteína de espinaca en western blots era de 1:3000.

Por western blot se estableció por la presencia de una sola banda alrededor de los 27kDa (la 24RNP migra siempre a este peso, lo que puede deberse a su plegamiento o a su carga) que coincide con la banda que aparece en el extrato de cloroplastos de hojas de espinaca que el anticuerpo anti-24RNP no reconocía proteínas de bacteria distintas de la 24RNP recombinante (Figura 1).

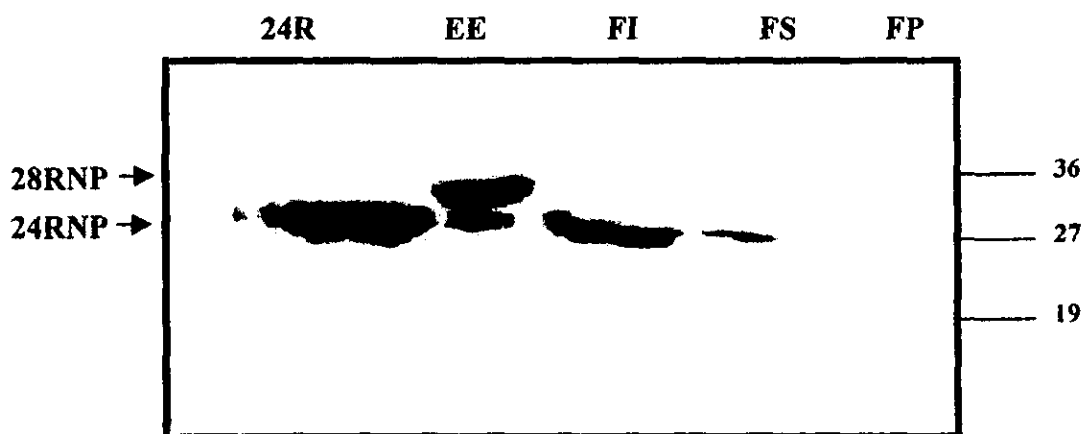


**Figura 1. Producción de la 24RNP de espinaca recombinante en *E. coli* (M15).** Western blot con anticuerpo anti-24RNP (dilución 1:3000) de cultivos en pequeña escala. El western fue revelado por ECL. La inducción de expresión se realizó con 2 mM de IPTG por 4 hrs. EE, extracto de hojas jóvenes de espinaca (20 µg de proteína); 24R, extracto de bacterias con pQE-24RNP en buffer de 8M urea (20 µl de 200µl); C1, bacterias con pQE-24RNP no inducidas; C2, bacterias con pQE sin inserto, no inducidas y C3, inducidas; C4, bacterias M15 sin pQE inducidas y C5, no inducidas.

Nota: en el carril C3 se observa una señal que resulta del exceso de cargado en el carril EE, se utilizó este western debido a que fue en el que se observaban mejor las otras muestras cargadas. En repeticiones de este experimento se pudo comprobar que no se presenta señal alguna en C3.

Para establecer el método de purificación de la proteína recombinante se realizaron experimentos de localización subcelular de esta proteína (separando en fracciones citoplásmica o soluble, FS; periplásmica, FP e insoluble, FI). De acuerdo a los resultados obtenidos (Figura 2), la mayor parte de la 24RNP producida en las bacterias, se va a cuerpos de inclusión (fracción insoluble) (Figura 2, carril FI), por lo que hubo necesidad de modificar los parámetros de inducción de la expresión de la proteína con el fin de tratar de solubilizar

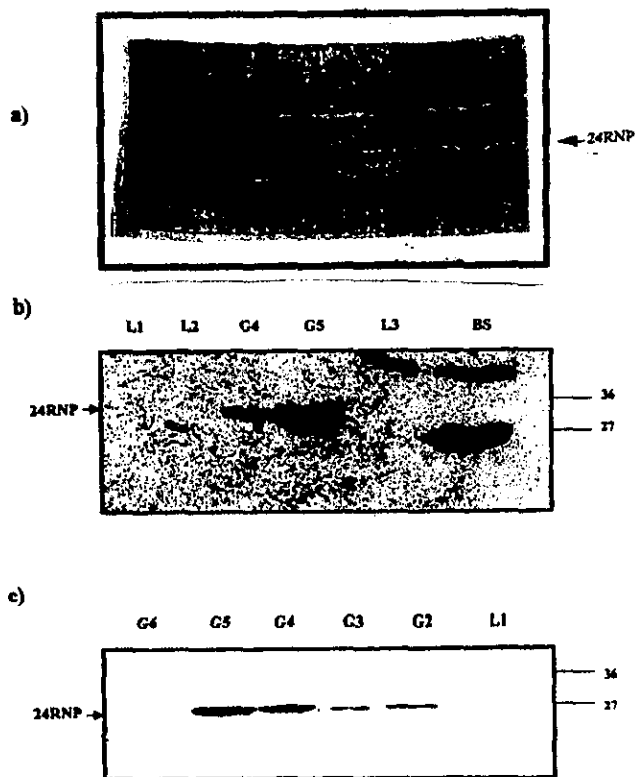
la mayor cantidad posible de proteína recombinante. Se probó dar un tratamiento a la pastilla bacteriana con Tween 0.5% a fin de liberar parte de la proteína atrapada en los cuerpos de inclusión, pero este tratamiento resultó sólo medianamente efectivo.



**Figura 2. Localización subcelular de la 24RNP recombinante producida en células de *E.coli* M15 inducidas a 32 °C durante 5 hrs con 0.5 mM de IPTG. Western blot con anticuerpo anti-24RNP (dil 1:3000). Muestras cargadas en gel de acrilamida al 12 %: 24R, extracto de bacterias transformadas con la construcción pQE 24RNP inducidas con IPTG (20µl de 1 ml); EE, extracto de hojas maduras de espinaca (20 µg de proteína); FI, fracción insoluble (10 µl de 500 µl); FS, fracción soluble (40 µl de 500 µl); FP, fracción periplásmica (40 µl de 500µl).**

Los parámetros que se modificaron para procurar la solubilización de la mayor cantidad posible de proteína fueron: temperatura de inducción (se redujo de 37 °C a 32 °C), tiempo de inducción, menor velocidad de agitación y cantidad de IPTG (reduciendo de 2 mM a 0.5 mM). Aún cuando no se logró la solubilización total, si se obtuvo suficiente cantidad en el sobrenadante (Figura 2, carril FS) como para realizar la purificación final en condiciones nativas sin necesidad de detergentes ni agentes desnaturizantes que pudieran modificar el plegamiento de la proteína y con ello alterar sus propiedades.

Una vez lisadas las bacterias, se trabajó en hielo, pues existen proteasas que al liberarse son capaces de degradar parcialmente a la proteína. La purificación final se realizó a partir de 1 L de cultivo bacteriano inducido con 0.5 mM de IPTG a 32 °C por 7 hrs, el sobrenadante de la sonicación se incubó con la resina Ni-NTA la cual posee afinidad por la etiqueta de seis histidinas. La elución se realizó con un gradiente de imidazol de 0.1 a 0.6 M. observándose elución de la proteína desde 0.2 M (Figura 3b y c, carriles G2-G6), aunque la mayor cantidad se concentró en la fracción de 0.5 M de imidazol (Figura 3b y c, carril G5), de acuerdo a la intensidad de señal observada en el western blot (Figura 3).



**Figura 3. Purificación de la 24RNP de espinaca recombinante por columna de resina Ni-NTA.** a) Gel de acrilamida al 12 % teñido con azul de Coomassie. Bacterias transformadas con pQE-24RNP, inducidas por 8 hrs a 32 °C con 0.5 mM de IPTG. BI, bacterias inducidas antes de sonicar (20  $\mu$ l); BS, bacterias inducidas después de la sonicación (20  $\mu$ l); SN, sobrenadante del lisado después de la incubación con la resina (20  $\mu$ l); M, marcador de peso molecular; L, L1 y L3, lavados de la resina con buffer de lavado (40  $\mu$ l de 3 ml); G2 a G6, fracciones eluidas con gradiente de imidazol: 0.2 M, 0.3M, 0.4M, 0.5M y 0.6 M (de cada fracción se cargaron 30  $\mu$ l de 3 ml totales). b) y c) Western blot con anticuerpo anti-24RNP (dilución 1:3000) revelado por ECL. Se cargaron en cada carril 30  $\mu$ l de muestra.



La 24RNP se trató de producir en un sistema eucariote (*Pichia pastoris*, PVX) para cubrir probables modificaciones post-traduccionales importantes en su funcionamiento, mas se tuvieron dificultades como por ejemplo que en la transformación de *E. coli* con el plásmido pPICZB (que es el que se requiere para realizar la recombinación con el genoma de la levadura) donde se habían clonado la 24 y 28RNPs de espinaca sin péptido de tránsito, las bacterias crecían con mucha dificultad en medio sólido y no crecían en líquido lo que imposibilitaba el obtener plásmido necesario para transformar levadura o para el sistema PVX, no fue posible obtener el transcrito para la infección de las plantas. Debido a estos problemas, no se logró la expresión en un sistema eucariote, por lo que se trabajó finalmente con la proteína bacteriana. Considerando que la 24RNP es una proteína que funciona en el cloroplasto, las enzimas encargadas de modificarla muy probablemente esten presentes en él, por ello la 24RNP recombinante se incubó en extracto de cloroplastos recién lisados tratados con luz (durante 4 hrs) y posteriormente se volvió a purificar por columna de afinidad con resina Ni-NTA.

### **3. Preparación de un extracto de procesamiento de mRNAs a partir de cloroplastos de espinaca.**

La preparación del extracto purificado de hojas jóvenes de espinaca se efectuó de acuerdo a la técnica desarrollada por Gruissem y Schuster (1989) y descrita en materiales y métodos. Se eligieron hojas jóvenes de espinaca dado que en estudios efectuados con plantas en diferentes estadios de desarrollo, se observó que la 24RNP es más abundante en hoja joven que en hoja madura, en tanto que la 28RNP presenta un patrón de expresión inverso. A partir de 1 kg de hojas jóvenes se obtuvieron después de la última diálisis, 800  $\mu$ l de extracto de procesamiento (EP) con una concentración de 9.7  $\mu$ g de proteína/ $\mu$ l de extracto. Dado que en los experimentos de procesamiento *in vitro* se requiere añadir 20  $\mu$ g de proteína por ensayo se usaron 2  $\mu$ l por reacción.

Antes de realizar los experimentos de inmunosubstracción del extracto, se probó la eficacia de éste para procesar extremos 3' de la UTR de mRNAs de cloroplasto en un experimento contra tiempo.

El extremo 3' UTR utilizado en todos los experimentos de procesamiento *in vitro* fue el del gen cloroplástico *petD*. Para la obtención del RNA marcado con  $^{32}\text{P}$ - UTP que se necesita en este tipo de ensayos, se efectuó una transcripción *in vitro* (materiales y métodos sección 6.5.2.). En la Figura 4 se presentan los resultados típicos del procesamiento del extremo 3' de *petD* contra tiempo. El precursor es de 267 nt y el producto procesado de 209 nt. Como se puede observar, al aumentar el tiempo de incubación del precursor con el extracto de procesamiento purificado de cloroplastos de espinaca, la cantidad de producto procesado aumenta, observándose una banda de 209 nt más intensa.



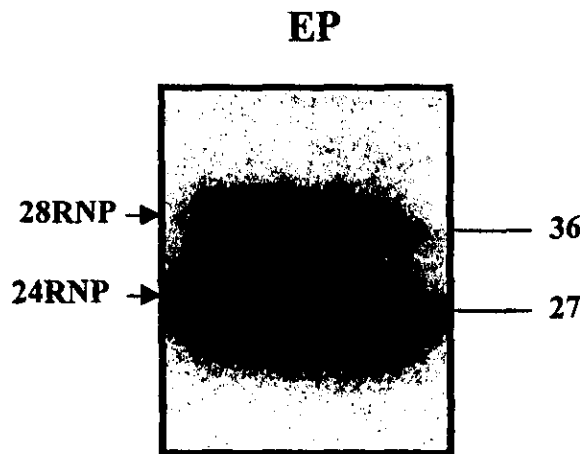
**Figura 4.** Experimento de procesamiento *in vitro* del precursor marcado ( $^{32}\text{P}$ -UTP) del extremo 3' del gen *pet D*. Se utilizaron 2000 cpm por carril y diferentes tiempos de incubación con el extracto de procesamiento obtenido de hojas jóvenes de espinaca (20  $\mu\text{g}$ ). Autoradiografía de un gel de acrilamida-urea al 6%. C, control de RNA marcado sin agregar extracto proteico; 5 ,15 ,30 y 60 muestras obtenidas a los tiempos señalados (en min) al incubar con el extracto de procesamiento de cloroplastos de espinaca el precursor marcado.

#### 4. Purificación del anticuerpo anti-24RNP por columna de afinidad con el antígeno.

Como se observó en varios westerns realizados con cloroplastos y extractos totales de espinaca, el anticuerpo anti-24RNP tiene una reacción cruzada con la 28RNP (Figura 5).

Como se muestra en la figura, se detectan dos bandas una de 27 kDa y la otra de cerca de 36 kDa (la 28RNP también tiene una migración diferente a la que se esperaría tomando en cuenta únicamente su tamaño) que corresponden a la 24RNP y a la 28RNP respectivamente. El reconocimiento de ambas proteínas, suponemos que se debe a la gran semejanza que existe entre ellas y representa un aspecto que dificulta el análisis por separado de su función durante el procesamiento de extremos 3' de mRNAs. Ya que se contaba con la 24RNP recombinante purificada y la clona de la 28RNP en el vector de expresión pQE-31 que nos fue amablemente proporcionada por el Dr. Gadi Schuster del Technion-Israel Institute of Technology, se propuso intentar la limpieza de los anticuerpos por columnas de afinidad con los distintos antígenos. Para ello se prepararon dos columnas de agarosa activada, a una se le unió la 24RNP recombinante y a la otra la 28RNP recombinante.

El anticuerpo anti-24RNP se pasó primeramente por la columna con la 28RNP y posteriormente por la columna con la 24RNP. Después de eluir la fracción de anticuerpo que se pegó a la columna, se dializó y se volvió a probar en western. Como se muestra en la Figura 5b no se logró una detección específica de la 24RNP sino que se mantuvo el reconocimiento de ambas proteínas. Ante ésta situación lo que se decidió fue realizar experimentos de inmunosubstracción con este anticuerpo considerando que se retirarían del extracto la 24 y 28RNPs y por otro lado inmuno-substreaer el extracto de procesamiento con un anticuerpo anti-28RNP que por haber sido generado contra el dominio ácido de la proteína no presenta reacción cruzada con la 24RNP. Con esta aproximación se buscó establecer si el papel de ambas proteínas es o no el mismo durante el procesamiento de extremos 3' de mRNAs de cloroplasto.



**Figura 5. El anticuerpo anti-24RNP reconoce también a la 28RNP de espinaca.**

Western blot revelado por ECL donde se observa la reacción cruzada del anticuerpo anti 24RNP (dilución 1:3000) con la 28RNP. EP, 20  $\mu$ g de extracto de procesamiento de espinaca de hojas jóvenes se corrieron en un gel de acrilamida al 12 %.

**5. Inmunosustracción del extracto de procesamiento empleando el anticuerpo anti-24RNP y comprobación de la eficiencia del procesamiento con el extracto inmunosustraido.**

Como se describe en materiales y métodos (6.6.1.), la primera opción que se intentó para lograr la inmunosustracción de la 24RNP fue el acoplar el anticuerpo anti-24RNP a proteína A por medio de un agente entrecruzante (Dimetil pimelimidato, DMP). De acuerdo con la sugerencia dada en la técnica empleada, se probó incubando con agitación la mezcla de proteína A-anticuerpo-extracto de espinaca por 1 hr a temperatura ambiente, acto seguido se dejó separar por gravedad y el sobrenadante se corrió en un gel de acrilamida para probar por western blot con anticuerpo anti-24RNP si se había logrado la eliminación

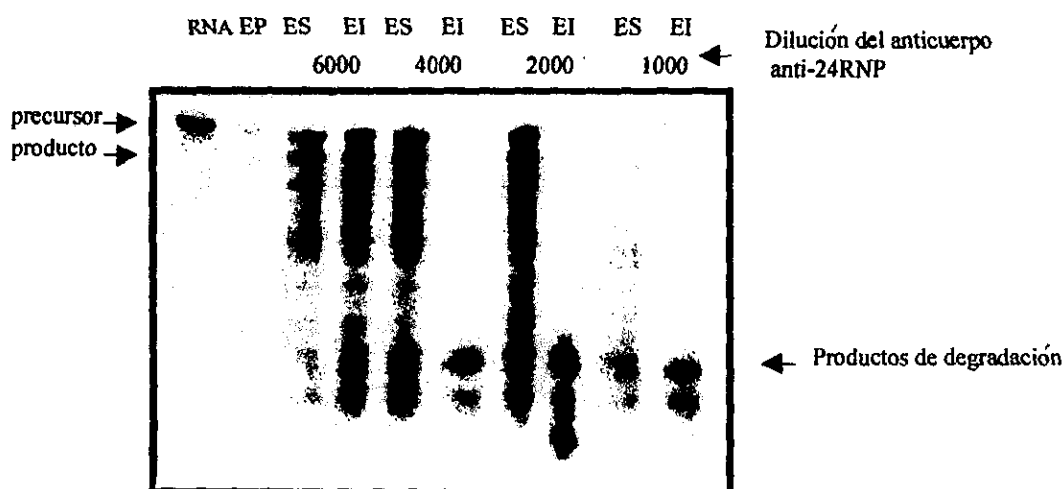
de la proteína del extracto. El experimento no fue exitoso ya que aún se detectaba la 24RNP en el extracto. Se repitió el experimento, aumentando el tiempo de contacto de la proteína A-anticuerpo con el extracto de procesamiento con incubación toda la noche a 4 °C, aunque con este tratamiento se logró disminuir la 28RNP considerablemente, la 24RNP seguía presente.

Dado que esta técnica no fue efectiva para eliminar la 24RNP del extracto de procesamiento. Se probó como otra opción la de incubar directamente el extracto en presencia de un exceso de anticuerpo. Se sabe que la unión del anticuerpo con su antígeno se trata de un proceso dinámico, mas la probabilidad de que ante por la gran cantidad de anticuerpo presente en el ensayo, el antígeno se encuentre secuestrado se incrementa considerablemente. Esto nos permitiría analizar el efecto del secuestro por el anticuerpo de las dos proteínas del extracto protéico de espinaca sobre el procesamiento del RNA. Cabe hacer notar que debido a la reacción cruzada del anticuerpo, la probabilidad de que la 28RNP se encuentre también secuestrada en estas condiciones es bastante alta.

Para probar la nueva estrategia, se incubó el extracto de procesamiento con diferentes diluciones del anticuerpo anti-24RNP (se probaron diluciones desde 1:50 hasta 1:7000), utilizando como control el suero pre-inmune a las mismas concentraciones con la finalidad de verificar que cualquier alteración que se detectara en el procesamiento de RNA por incubación del extracto con el anticuerpo, no se debiera a exceso de proteína presente o a alguna actividad de RNAsa no propia del extracto (Figura 6, ES muestras tratadas con suero pre-inmune, EI, muestra tratadas con anticuerpo anti-24RNP)

Con este nuevo enfoque cuando se corrieron las muestras incubadas por 60 minutos en presencia del anticuerpo en un gel de acrilamida-urea al 6%, se observó que a concentraciones altas del anticuerpo se tenía degradación del RNA en tanto que a concentraciones más bajas (1:6000) no había alteración en el procesamiento (se observan dos bandas, una de 267 nt que corresponde al precursor no procesado y una de menor tamaño que es el producto procesado). Los controles con el suero pre-inmune, en donde el procesamiento se mantuvo a niveles normales, indicaban que el efecto de degradación que se observaba en los tratamientos con anticuerpo era atribuible al secuestro de las proteínas 24RNP y/o 28RNP.

Se prosiguió a ajustar las concentraciones de anticuerpo en las que se lograra detectar un efecto adverso sobre el procesamiento. Así, se estableció que a una dilución de 1:6000 el extracto era aún capaz de procesar el precursor marcado, pero a 1:4000, ya no lo era y en el gel se observaba degradación. En ninguna de las dos concentraciones se observaban alteraciones en procesamiento al incubarse con suero preinmune (En la Figura 6, concentración de suero-preinmune 1:1000 se tuvieron problemas de recuperación de la muestra después de las extracciones con fenol-cloroformo y la precipitación con etanol, pero se alcanzan a detectar muy ténues las dos bandas del producto procesado y el precursor sin procesar). De este modo, la dilución del anticuerpo anti-24RNP establecida para probar en experimentos de reconstitución fue de 1:4000 ya que a partir de aquí no se detecta procesamiento alguno (Figura 6).



**Figura 6. Experimento de procesamiento *in vitro* del extremo 3' del gen *petD* marcado con  $^{32}\text{P}$ -UTP incubando con diferentes diluciones de anticuerpo anti-24RNP. RNA, incubación sin agregar extracto proteico de espinaca; EP, incubación con extracto de procesamiento de hojas de espinaca jóvenes; EI, incubación con diferentes diluciones de anticuerpo o ES, suero preinmune. Para el experimento se utilizaron 20  $\mu\text{g}$  de extracto de procesamiento, 2000 cpm y 60 min de incubación. Autoradiografía expuesta 24 hrs.**

## 6. Obtención de la 28RNP recombinante expresada en un sistema eucariote.

Considerando el hecho de que el anticuerpo anti-24RNP reconoce no sólo a la 24RNP, sino que también a la 28RNP y que por ello en un experimento de inmunosubstracción se estarían retirando del extracto de procesamiento ambas proteínas, se hizo necesario contar con la 28RNP recombinante purificada, para poder analizar el efecto de devolver al extracto por separado las proteínas y verificar si con ello se recuperaba la capacidad de procesamiento *in vitro* de extremos 3' de mRNAs de cloroplasto.

Se sabía, por los experimentos realizados en el laboratorio del Dr. Schuster que la proteína recombinante obtenida a partir de la expresión en pQE-28RNP en bacteria, no era funcional para reconstituir la actividad de procesamiento en extractos de espinaca, pues por tratarse de un sistema procarionte la proteína recombinante no poseía las modificaciones post-traduccionales necesarias para hacerla activa. En particular, se sabe que la 28RNP es capaz de ser fosforilada en el extracto de cloroplasto por una cinasa del tipo caseína cinasa II en el residuo Ser-22 (que forma parte del dominio ácido de la proteína). Esta fosforilación modifica sus propiedades de unión a RNA y es posible que también modifique su capacidad de unión a otras proteínas que forman parte de la maquinaria de procesamiento de RNA en cloroplasto (Lisitsky y Schuster, 1995). Con estos antecedentes se decidió subclonar este gen en un vector de expresión eucariote. A partir de la clona en pQE, se obtuvo el inserto (que constaba de la 28RNP sin el péptido de tránsito) y se aprovechó la etiqueta de seis histidinas.

Dentro de los sistemas de expresión en células eucariotes con los que se contó estuvo el sistema *Pichia pastoris* de expresión en levadura. Para subclonar la 28RNP madura con su etiqueta de histidinas no se contaba con los sitios de restricción correctos, por lo que hubo necesidad de introducir por PCR sitios *Eco RI* y *Xho I* para poder emplear el vector bacteriano pPICZB a partir del cual se realiza la recombinación con el genoma de la levadura.

Como se contaba también con la clona de la 24RNP en pQE, se probó clonarla también en este sistema de levadura y prever alguna complicación en experimentos posteriores por modificaciones post-traduccionales que el sistema bacteriano no pudiera

realizar. Para el caso de la 24RNP fue necesario diseñar oligos con sitios de restricción *Xho* I y *Xba* I.

Previo a la utilización del vector pPICZB, se subclonaron ambas proteínas en pCR 2.1 con el fin de verificar que los sitios de restricción introducidos se encontraran intactos y que la secuencia de las proteínas no hubiera sufrido modificaciones durante los ciclos de amplificación por PCR (para reducir este riesgo se empleó también DNA polimerasa *Pfu* de alta fidelidad). Una vez verificada la secuencia, se realizó la subclonación en el vector pPICZB, se transformaron células DH5 $\alpha$  y se plaqueó en medio LB bajo en sales con Zeocina (Zeo) como medio de selección.

Desde la primera transformación realizada, se detectaron problemas que en un principio se atribuyeron a las células competentes empleadas: la eficiencia de la transformación fue bastante baja y las colonias muy pequeñas. Por ello se incluyó el control de transformación con el vector pPICZB sin inserto y se cambió a células JM 109. Sin embargo, ésto no mejoró ni la eficiencia de transformación ni la capacidad de las células para crecer. La presencia del pPICZB con inserto fue confirmada en las pocas colonias obtenidas, realizando PCR con oligos contra regiones internas de la secuencia de las proteínas 24 o 28RNP.

Las clonas que se encontraron positivas, se sembraron en medio líquido LB bajo en sales con Zeocina, más no se logró el crecimiento de las bacterias. Se intentó cambiando nuevamente la cepa a TOP10F' (para este sistema se requiere de células que sean deficientes en recombinación *recA* y deficientes en endonucleasa A *endA* y no posean el gen T5 que confiere resistencia a Zeo, lo que reduce las posibilidades a DH5 $\alpha$ , JM109 y la serie TOP10F) sin que ello mejorara los resultados. En todos los casos, el control transformado con el vector vacío no presentó problemas de crecimiento ni en placa ni en medio líquido, lo cual sugería que el producto sobre-expresado de estos genes era lo que resultaba tóxico para las bacterias transformadas.

Ante esta situación, se decidió cambiar de sistema y probar la expresión en un vector viral, para producir la proteína en plantas de *Nicotiana benthamiana* infectadas con el virus PVX. El sistema elegido fue el del virus de la papa X (PVX), que se ha empleado con éxito



para la expresión de proteínas ajenas al virus. PVX infecta a la planta de manera sistémica y la permanencia de los insertos en el vector es relativamente estable (Chapman, *et al.*, 1992).

Las clonas en pQE tanto de la 24RNP como la de la 28RNP fueron cortadas con *EcoR* I y *Hind* III para obtener el inserto incluyendo la etiqueta de histidinas que no posee el vector PVX. Después de rellenar con Klenow y ligar por extremos romos en el vector PVX, se verificó la orientación de las clonas para realizar la transcripción *in vitro* con T7 RNA polimerasa y con el transcrito se infectaron plantas de *Nicotiana benthamiana*. Para el caso de la 28RNP no hubo problema durante la transcripción *in vitro*, mas para la 24RNP no se logró obtener a pesar de repetirse el experimento en varias ocasiones. Por esta razón, solamente se expresó en este sistema la 28RNP de espinaca. Para cubrir posibles modificaciones post traduccionales de la 24RNP hubo que implementar otro sistema a partir de la proteína recombinante purificada de bacteria (materiales y métodos sección 6.3.6.).

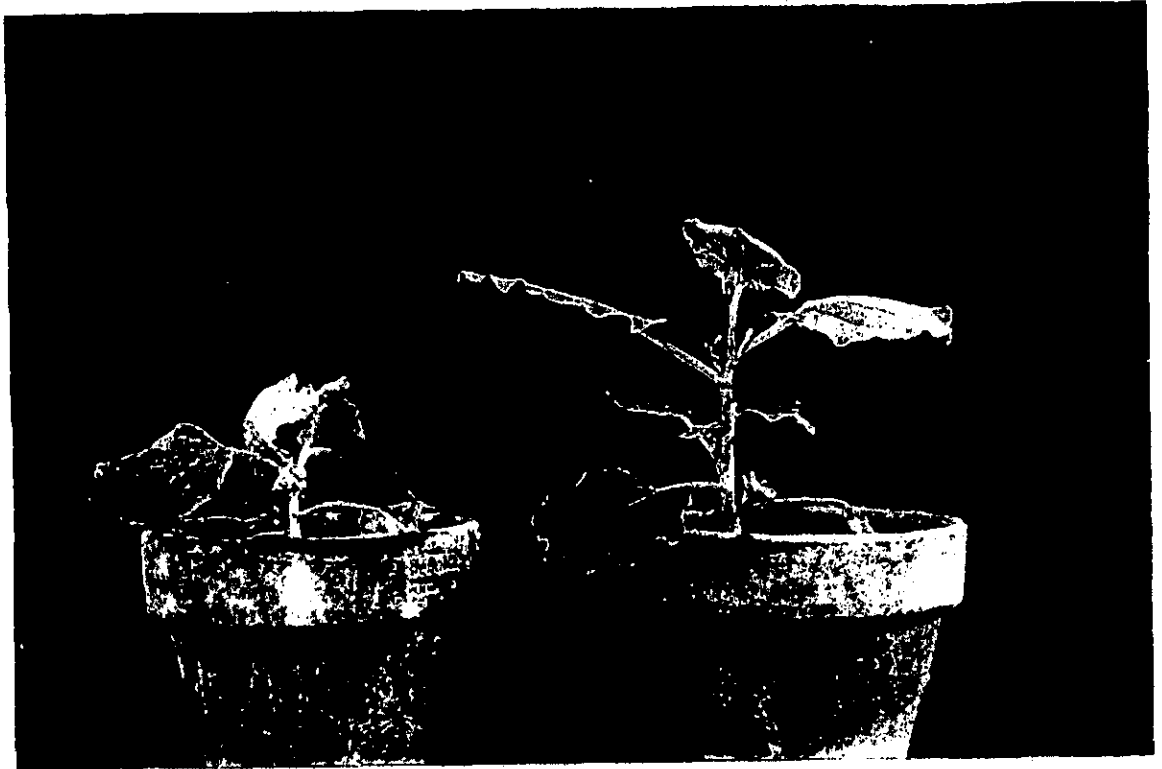
Las primeras plantas infectadas con la construcción PVX-28RNP se inocularon con 5 y 10  $\mu$ l del transcrito del vector PVX donde se clonó la 28RNP, mezclado con bentonita. Como controle se usó una planta no infectada con el virus y otra infectada con PVX que no poseía inserto.

Los síntomas de infección en la planta empezaron a aparecer 10 días después de la inoculación, mas no eran del todo claros. A los 20 días, los síntomas de infección eran severos para la planta con la construcción PVX-28RNP (10  $\mu$ l). Ésta, en comparación con el control infectado con PVX, tenía alteraciones en su crecimiento (más pequeña que ambos controles) (Figura 7a) y la hojas desarrollaron además de mosaicos en las hojas, un color amarillo notable (Figura 7b). Después de un mes, esta primera planta hubo de ser cortada y todo el tejido incluyendo tallos fue cosechado, pues la infección era muy severa y la planta empezó a morir (Figura 7c).

a)

PVX-28RNP

PVX



b)

C

PVX-28RNP

PVX



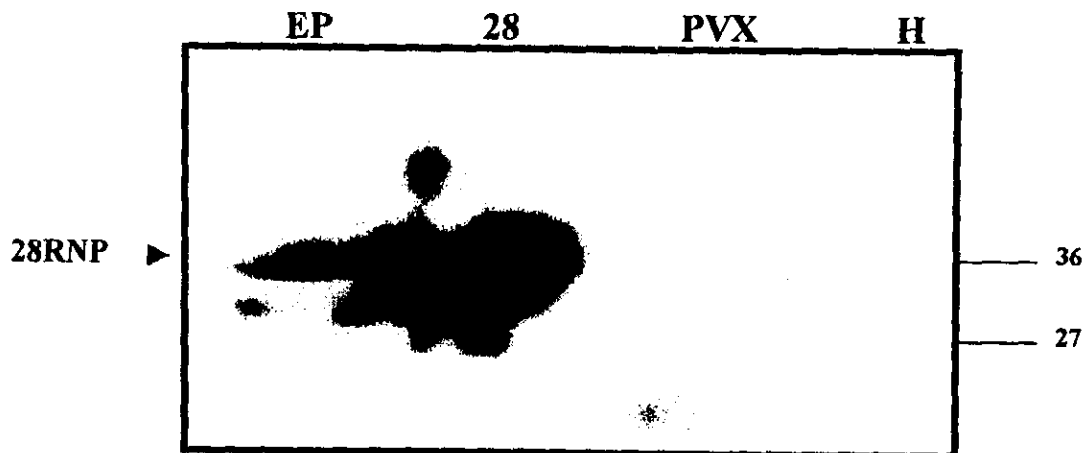
c)



**Figura 7. Primera planta de *Nicotiana benthamiana* infectada con la construcción PVX-28RNP. a) Después de 20 días de la infección con: construcción PVX-28RNP, que produce la 28RNP de espinaca; PVX, vector viral PVX sin inserto; b) Acercamiento a las hojas de después de 20 días de la infección C, planta control no infectada. c) plantas después de un mes de la infección.**

Para verificar que la 28RNP estaba siendo producida en el sistema, se tomaron muestras de hoja y se homogenizaron en buffer de carga para SDS-PAGE con el fin de correr un primer western con anticuerpo anti-28RNP. En la muestra de la planta PVX-28RNP se detectó una señal de gran intensidad alrededor de 34 kDa (Figura 8, carril 28). No hubo señal alguna en los controles empleados: tejido de la planta no infectada (Figura 8, carril H) y tejido de la planta infectada con el virus PVX (Figura 8, carril PVX). No se observó en el western la 28RNP de tabaco probablemente porque la cantidad endógena de 28RNP en la planta es muy poca comparada con la cantidad de proteína sobre-expresada y el anticuerpo utilizado no reconoce con la misma afinidad a la proteína de tabaco que a la de espinaca. Para verificar la purificación de la 28RNP se podría realizar con resina de Ni-NTA, se realizó aparte un wester blot con un anticuerpo dirigido contra la etiqueta de histidinas

donde se obtuvo el mismo tipo de señal que con el anticuerpo anti-28RNP (resultado que no se muestra).



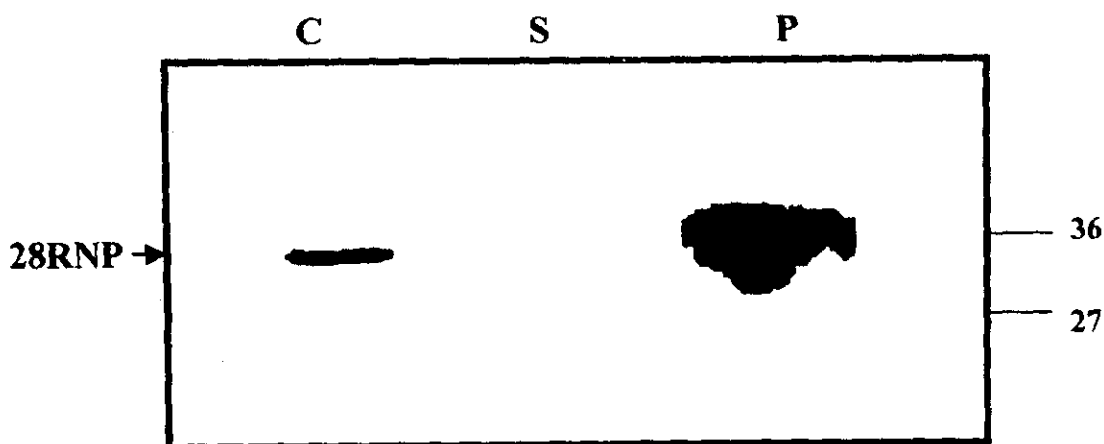
**Figura 8. Producción de la 28RNP de espinaca empleando el sistema PVX.** Western blot con anticuerpo anti-28RNP (dilución 1:1000). 30 mgs de hoja se trituraron con 60  $\mu$ l de buffer de carga para geles de PAGE-SDS. Se tomaron 20  $\mu$ l de muestra que se cargaron en un gel de acrilamida al 12 %. Muestras: H, extracto de hoja de planta no infectada de *Nicotiana benthamiana*; EP, extracto de procesamiento de espinaca hojas jóvenes (20  $\mu$ g); PVX-28RNP, extracto de hoja infectada con la construcción PVX-28RNP; PVX, extracto de planta infectada con el virus PVX.

Una segunda planta fue infectada con 10  $\mu$ l de transcrito. Esta presentó los primeros síntomas de infección más tardíamente que la primera (a los 20 días). Al mes se tomó la primera muestra de tejido para verificar la producción de la proteína que resultó estar presente pero en menor cantidad que en la primera planta. Los síntomas de infección además, no eran tan severos, se presentaron los mosaicos en las hojas y una coloración amarillenta, pero la planta no tuvo retardo en su crecimiento con respecto a las plantas control ni después de 50 días de infección, que fue cuando se cosechó todo el tejido. A pesar de que se había perdido la infección en las hojas más jóvenes, las hojas maduras y el tallo seguían manteniendo la construcción y produciendo la proteína, si bien en menor cantidad que la primera planta infectada. De aquí se concluyó que si bien el sistema de expresión en plantas infectadas con el virus PVX resulta efectivo para la obtención de la

28RNP recombinante, el exceso de esta proteína no deja de provocar alteraciones sobre el sistema donde se produce.

#### **7. Purificación de la proteína recombinante 28RNP por columna de resina Ni-NTA a partir de hojas de plantas infectadas con la construcción PVX-28.**

Después de determinar por un primer análisis por western blot que las plantas infectadas con la construcción PVX-28RNP producían la 28RNP, se procedió a determinar la localización celular de dicha proteína. Se separaron fracciones membranales y citoplásmicas. Por un nuevo western blot se observó que la proteína estaba asociada a las fracciones membranales (Figura 9, carril P) y que poca cantidad se encontraba soluble (Figura 9, carril S). La razón aparente de esta localización es que el virus para replicarse se asocia a retículo endoplásmico. Buscando solubilizar la proteína se trató la pastilla con altas concentraciones de sales (1M LiCl) o bajas concentraciones de detergente (Tritón X-100 al 0.1%). El tratamiento con sales solubilizó un poco más de proteína, pero considerando que hay que dializar para eliminar el exceso de sales y concentrar antes de purificar, se decidió finalmente trabajar sólo con la fracción soluble inicial, incrementando la cantidad de tejido utilizado.

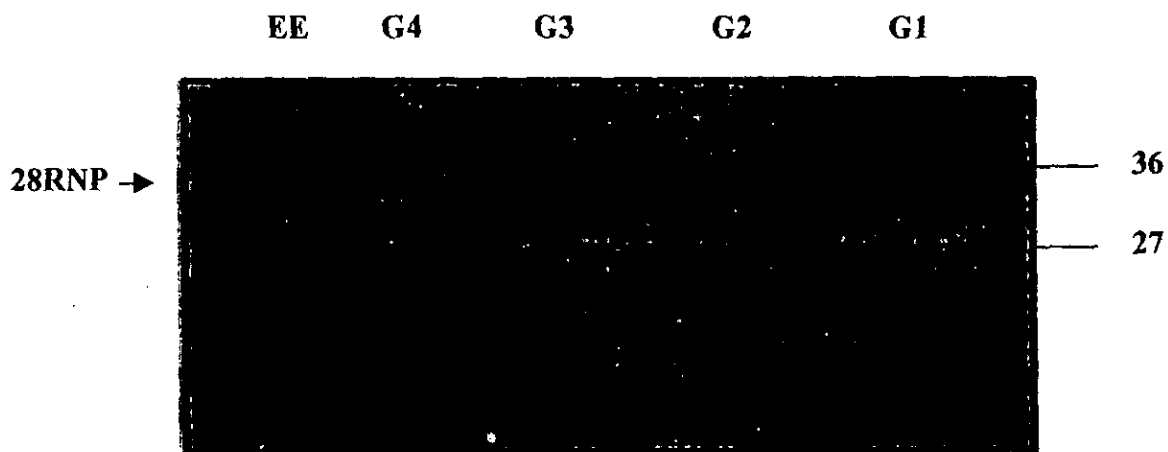


**Figura 9.** Fraccionamiento celular de tejido de plantas de *Nicotiana benthamiana* para la localización de la 28RNP recombinante. Western blot con anticuerpo anti-28RNP (dilución 1:1000). Se tomaron 75 mg de hoja que se trituraron con 250  $\mu$ l de buffer de extracción de proteínas (BEP), cargando 25  $\mu$ l de muestra en un gel de acrilamida al 12%. C, control de extracto total de hoja infectada con la construcción PVX-28RNP; S, fracción soluble; P, fracción membranal insoluble.

Para la purificación final se emplearon 2 g de tejido, la fracción soluble se incubó con la resina Ni-NTA toda la noche a 4 °C y acto seguido se realizaron los lavados y la elución con gradiente (0.1 a 0.5 M) de imidazol. La proteína recombinante eluyó de la resina a una concentración de imidazol de 0.1 M (Figura 10, carril G1). Se colectaron fracciones de elución de 1 ml las cuales fueron concentradas posteriormente a 200  $\mu$ l. El western realizado con el anticuerpo anti-28RNP demostró que se obtuvo proteína 28RNP recombinante en buena cantidad

Como control se preparó una columna en la que se incubó la fracción soluble de un extracto preparado a partir de la planta infectada con el virus PVX. En ninguna de las

fracciones aisladas de esta columna se localizó por western blot una proteína que fuera reconocida por el anticuerpo anti-28RNP (Figura 10).



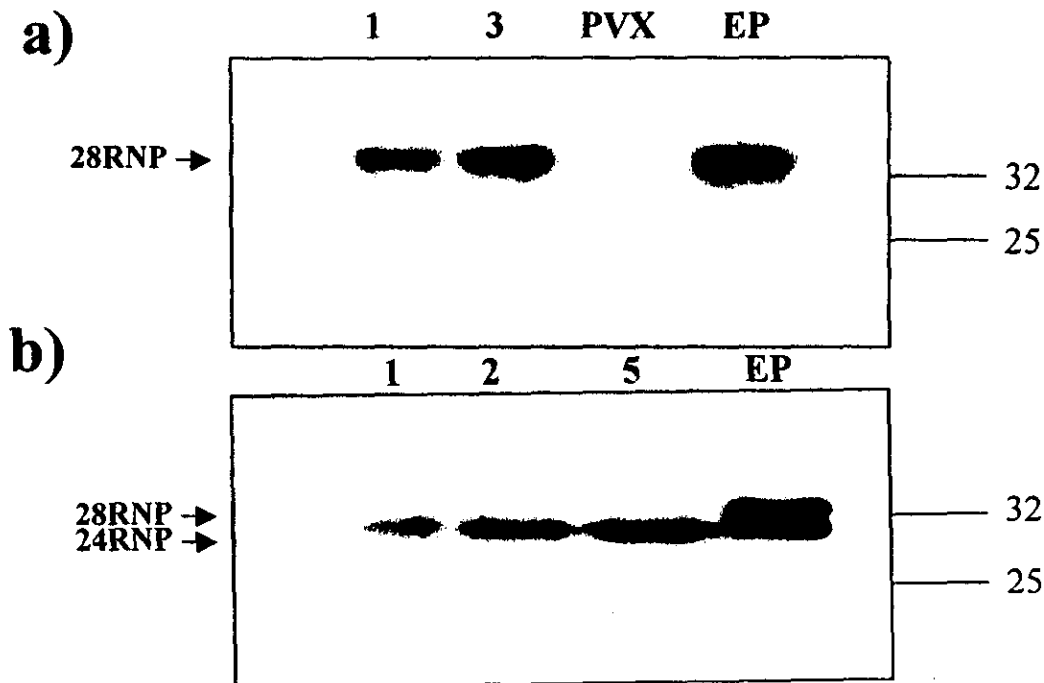
**Figura 10. Purificación de la 28RNP producida en el sistema PVX por medio de resina de Ni-NTA y elución con gradiente de imidazol. Western blot con anticuerpos anti 28RNP (dil 1:1000). Muestras: EE, extracto de cloroplastos de espinaca de hojas jóvenes (20  $\mu$ g de proteína); G 1 a 4, fracciones del gradiente de imidazol (concentraciones 0.1 a 0.4 M). De cada fracción se colectó 1 ml y se cargaron 20  $\mu$ l de muestra.**

#### **8. Estimación de la cantidad de proteínas 24RNP y 28RNP en el extracto de procesamiento de cloroplastos de espinaca.**

Para establecer la concentración de proteína recombinante a emplear en experimentos de reconstitución de extractos de procesamiento inmuno-substraídos, se preparó una dilución de las fracciones concentradas de proteína 24RNP (tratada por incubación con extracto de cloroplasto y re-purificada) y 28RNP. De esta dilución se cargaron en un gel de acrilamida diferentes volúmenes y por comparación de la intensidad de señal en western blots con anticuerpos anti-24RNP o anti-28RNP según el caso, se buscó igualar la cantidad de proteína presente regularmente en el extracto (Figura 11, carril EP). De esta manera se estableció lo que se consideraría la concentración de proteína 1X, que

para la 24RNP fue de 1  $\mu$ l de la dilución 1:100 (Figura 11b, carril 1) y para la 28RNP 1  $\mu$ l de una dilución 1:1000 (Figura 11a, carril 1).

Como controles para los experimentos de procesamiento *in vitro* de RNA, se concentraron las mismas fracciones de elución con imidazol obtenidas de la columna donde se incubó el extracto de la planta infectada con PVX o bien un extracto de bacterias que expresan una proteína que no es una RNP pero tiene una etiqueta de histidinas.

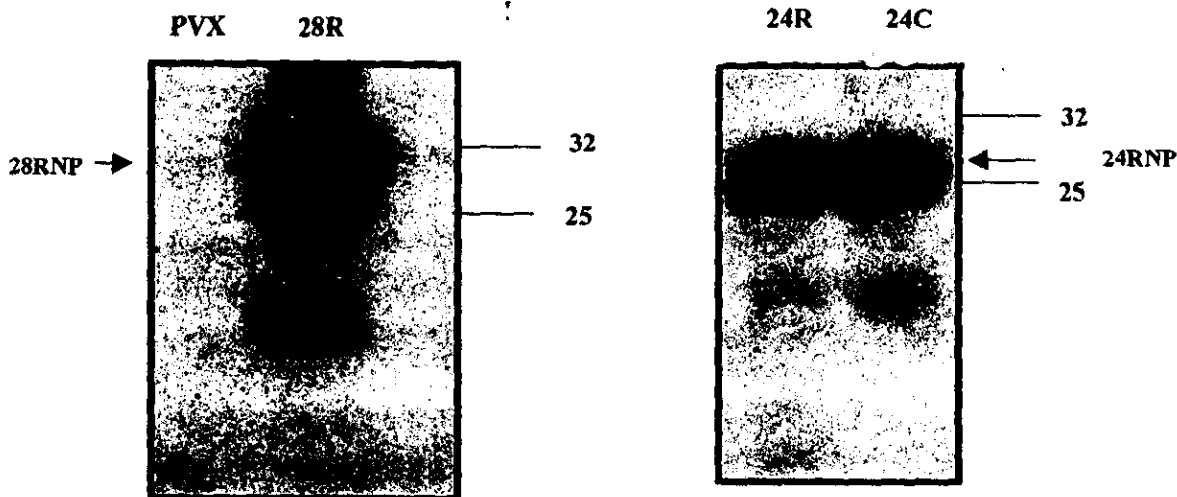


**Figura 11. Cuantificación de las proteínas 28 y 24RNPs en extractos de procesamiento de cloroplastos de espinaca. a)** Cuantificación de la 28RNP. Western blot con anticuerpo anti-28RNP (dil 1:1000). De la fracción eluída de la resina de Ni-NTA a 0.1 M de imidazol se preparó una dilución 1:1000 (28PVX) de la que se cargaron en un gel de acrilamida al 12 %, 1 y 3  $\mu$ l; PVX, control de fracción eluída a 0.1 M de imidazol de una planta infectada con PVX sin inserto; EP, (20  $\mu$ g) extracto de procesamiento de cloroplastos de espinaca. **b)** Cuantificación de la cantidad de 24RNP en el extracto de procesamiento de espinaca. Western blot con anticuerpo anti 24RNP (1:3000). De la fracción eluída con imidazol a 0.4 M se preparó una dilución 1:100 de la que se cargaron en un gel de acrilamida al 12 %, 1, 2 y 5  $\mu$ l cuya intensidad de señal se comparó con la obtenida en 20  $\mu$ g de extracto de procesamiento (EP).



## 9. Verificación de la capacidad de las proteínas recombinantes de unirse a RNA por ensayo de entrecruzamiento con luz ultravioleta.

Como un control previo a la utilización de las proteínas recombinantes en experimentos de reconstitución, se realizó un experimento de entrecruzamiento con luz ultravioleta incluyendo en él cinco veces la concentración que se había calculado como la presente en el extracto de cloroplasto. Con esto se verificó que la capacidad de unión al extremo 3' del gen *petD* se mantuviera tanto para la 24 como para la 28RNPs recombinantes. No se observó diferencia en cuanto a capacidad de unión al RNA (la intensidad de la señal es la misma) para la 24RNP incubada o no en extracto de cloroplastos de espinaca y re-purificada (Figura 12).



**Figura 12.** Ensayo de entrecruzamiento por luz UV de las proteínas recombinantes 24 y 28RNP con el extremo 3' de *pet D* marcado con  $^{32}$  P-UTP. Se utilizó 5 veces más de la proteína calculada en el extracto y 100,000 cpm de RNA. PVX, control de la fracción aislada a la misma concentración de imidazol que la 28RNP de un extracto de planta infectada con el virus PVX; 28R, 28RNP recombinante; 24R, 24RNP recombinante; 24C, 24RNP recombinante incubada por 6 h con un extracto de cloroplastos recién lisados y luz.

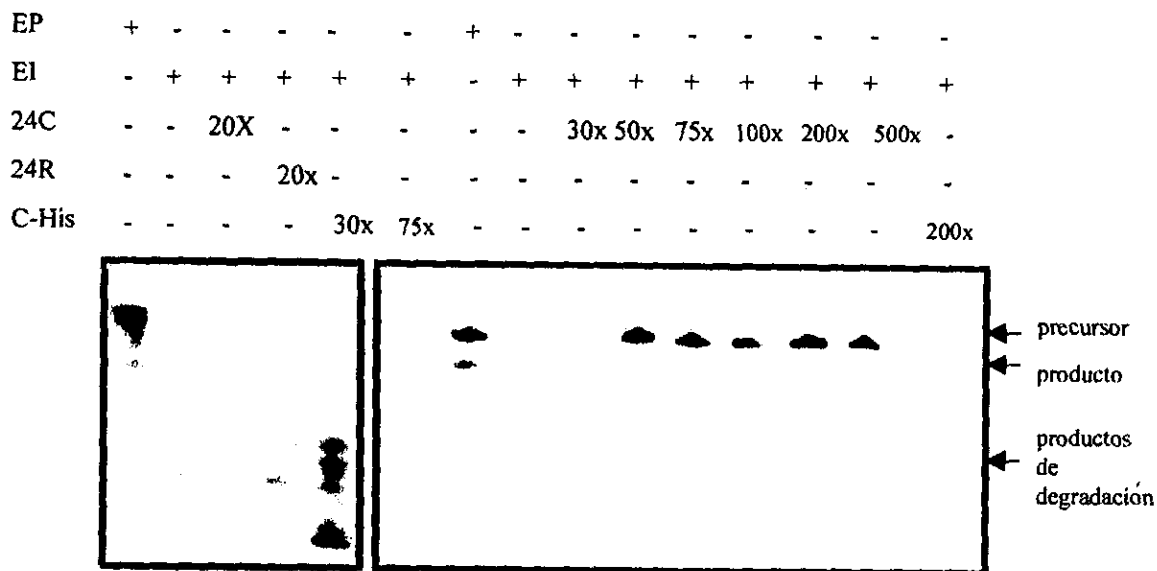
## **10. Experimentos de reconstitución del extracto inmunosubstraído con el anticuerpo anti-24RNP.**

En todos los experimentos realizados, se verificó previamente que ninguna de las proteínas adicionadas al extracto, ni el anticuerpo ni el suero pre-inmune, tuvieran actividades de RNAsa. Para ello se incubaron con el RNA marcado radiactivamente por 1h (que fue el tiempo de incubación utilizado para evaluar capacidad de procesamiento). Después del tiempo de incubación, se trató como si se hubiera incubado con extracto de procesamiento de mRNA de cloroplastos de espinaca, para verificar también la limpieza de los reactivos a utilizar. No se tuvo degradación en ningún caso, por lo que se concluyó que estaban libres de RNAsas.

La dilución de anticuerpo anti-24RNP utilizada fue de 1:4000 para estos experimentos, los controles empleados incluyeron: suero preinmune a la misma dilución (ver Figura 6) extracto de procesamiento sin tratamiento (EP); extracto de procesamiento tratado con el anti-24RNP (EI) e incubado con una proteína que posee una etiqueta de histidinas y no es una RNP (subunidad  $\alpha$  de la farnesil transferasa de tomate, His tag) (Figura 13) y para la 28RNP se usó como control la fracción de elución a 0.1M de imidazol de la resina Ni-NTA que fue incubada con el extracto de la planta de tabaco infectada con PVX (sin 28RNP) y concentrada por diálisis al mismo volumen que la fracción purificada de la 28RNP (Figura 14, muestra PVX). Las reconstituciones se realizaron con diferentes concentraciones de proteínas (24, 28 y ambas). Se añadió siempre un exceso considerando que se tenía el extracto incubado con el anticuerpo y que éste podría estar aún con capacidad de secuestrar las proteínas añadidas.

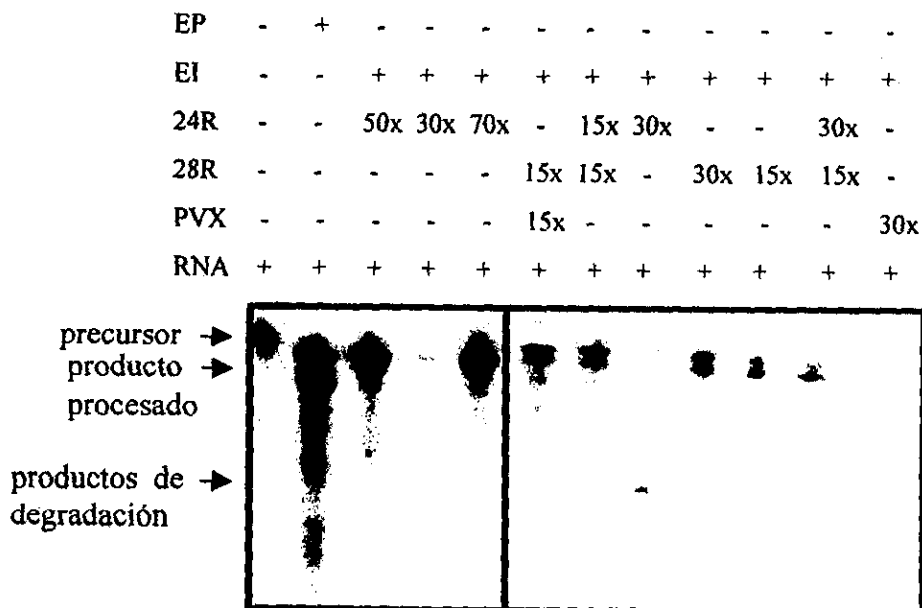
En el extracto incubado con el anticuerpo, sin haber agregado 24RNP recombinante, se observa degradación del RNA. Los resultados muestran que la 24RNP recombinante, a concentraciones de hasta 30X por si sola no recuperaba el procesamiento en el extracto inmunosubstraído y el RNA seguía siendo degradado (Figura 13). Si la concentración se elevaba a 50X ya no se presentaba degradación del precursor, pero éste seguía sin procesarse a su forma de menor tamaño. No hubo diferencia en el efecto cuando la 24RNP

usada para reconstituir era la incubada en el extracto de cloroplasto y luz o la que no se le había dado ningún tratamiento después de su purificación a partir de la bacteria (Figura 13).



**Figura 13. Reconstitución del extracto de procesamiento tratado con anticuerpo anti 24-RNP con la 24RNP recombinante.** Autoradiografía utilizando el extremo *petD* marcado con  $^{32}\text{P}$ -UTP y 20  $\mu\text{g}$  de extracto de procesamiento de hojas jóvenes de espinaca. EP, extracto de procesamiento sin tratamiento; EI, extracto tratado con anticuerpo a una dilución de 1:4000; 24R, recombinante sin pasar por extracto de cloroplasto o 24C, pasada por extracto de cloroplastos recién lisados; RNA, RNA marcado sin agregar extracto de procesamiento; C-His, control de proteína producida en bacteria con etiqueta de histidinas que no es una RNP; nX indica el número de veces que se agregó la proteína recombinante o control con respecto a la cantidad cuantificada en el extracto de procesamiento.

Cuando la reconstitución se realizó con la 28RNP recombinante se obtuvo algo diferente: a concentraciones bajas (2X-5X) se seguía observando degradación, pero cuando la concentración se incrementaba a 15 X ó más el efecto era una regeneración de la actividad procesiva del extracto (en la auto-radiografía del gel se observan las dos bandas del precursor y el producto procesado). El agregar las dos proteínas no producía diferencia con respecto a los resultados obtenidos al reconstituir con sólo la 28RNP (Figura 14).



**Figura 14. Experimentos de reconstitución del extracto de procesamiento tratado con el anticuerpo anti-24RNP empleando la 24RNP y la 28RNP recombinantes para reconstituir.** RNA, muestra a la que no se agregó extracto de procesamiento; EP, extracto de procesamiento al que no se le dio tratamiento; EI, extracto inmunosubstraído con el anticuerpo contra la 24RNP (dilución 1:4000); 24R, 24RNP recombinante; PVX, control de proteína obtenida por elución con el gradiente de imidazol 0.1 M de la planta infectada con el virus PVX; 28R, 28RNP recombinante; nX indica el número de veces la cantidad de 24RNP o 28RNP determinada en el extracto de procesamiento.

Estos resultados sugieren que las dos proteínas tienen una función diferente durante el procesamiento de los extremos 3' de mRNAs de cloroplasto: en el modelo que actualmente se maneja se propone que la 28RNP podría estar determinando el sitio donde una endonucleasa debe realizar el primer corte que lleve a la generación del extremo maduro, o bien otra posibilidad es que su función sea unirse al extremo 3' cerca de la estructura tallo-asa que se forma e impedir que las exo-nucleasas prosigan su corte más allá. Hasta el momento no es posible distinguir aún entre estas dos posibilidades, lo que si se confirma es que esta proteína, sin necesidad de interactuar con la 24RNP, es capaz de dirigir el procesamiento correcto de los extremos 3' de mRNAs. En tanto la 24RNP, parece estar relacionada con la estabilidad general del mensaje, pero no es suficiente para conseguir que la maquinaria de procesamiento actúe en ausencia de la 28RNP.

Contando con un anticuerpo específico contra la 28RNP que no presenta reacción cruzada con la 24RNP, debido a que fue generado contra el dominio ácido de la proteína (región donde mayores diferencias se presentan entre la 24 y la 28RNPs), se propuso realizar experimentos de inmunosustracción del extracto de procesamiento con este anticuerpo, a fin de corroborar las observaciones realizadas con el tratamiento con anticuerpo anti-24RNP.

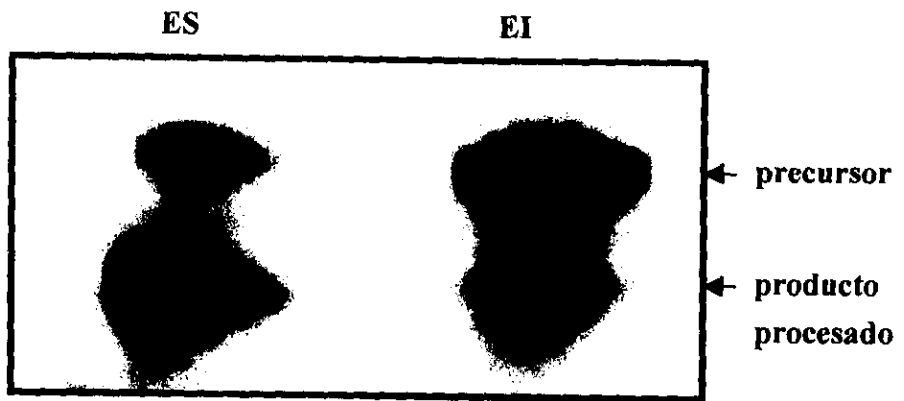
#### **11. Inmunosustracción del extracto de procesamiento con anticuerpo anti-28RNP.**

La técnica empleada fue, de nuevo, el unir covalentemente el anticuerpo anti-28RNP a proteína A. Se acoplaron 2 mg de anticuerpo y se incubó toda la noche en agitación a 4°C, con 100 µl del extracto de procesamiento. Después de la incubación se tomó el sobrenadante, se realizó una nueva cuantificación de proteína por Bradford y se verificó por western blot con 20 µg de proteína (la cual considerando la dilución que se tuvo durante la inmuno-sustracción correspondía a 3.5 µl de extracto). Para verificar que sólo la 28RNP había sido sustraída, se realizó un análisis por western blot corriendo en el gel de proteínas que se transfirió como control los 20 µg del extracto sin tratamiento, y la misma cantidad de proteína del extracto inmuno-sustraído. Se incubó con anticuerpos anti-24, 28 y 33 RNP. El experimento demostró que, eliminándose del extracto tan sólo la 28RNP, pero sin alterar

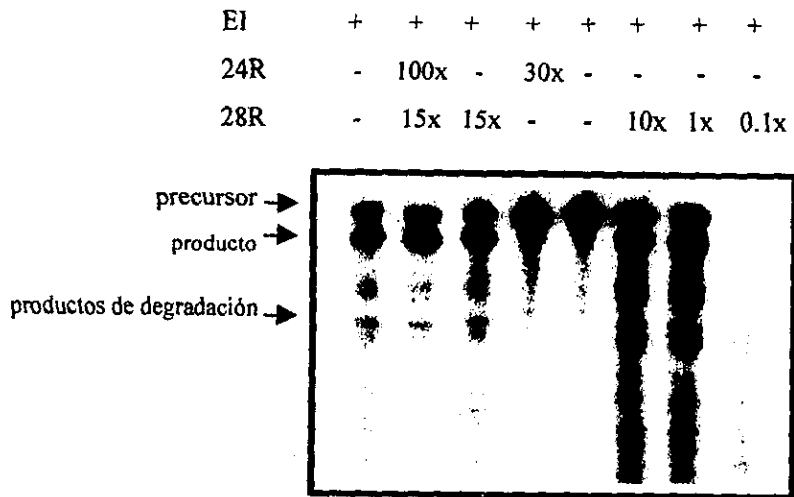
las cantidades endógenas de 24RNP y 33 RNP. Este extracto inmunosubstraído procedió a probarse en experimentos de procesamiento de RNA.

## **12. Experimentos de reconstitución con el extracto inmunosubstraído con el anticuerpo anti-28RNP.**

El extracto inmunosubstraído de la 28RNP al ensayarse en un experimento de procesamiento, demostró que si bien mantenía una ligera actividad, ésta se encontraba muy disminuida con respecto al extracto no tratado, donde a los sesenta minutos de iniciada la reacción, la cantidad de producto obtenido a partir del precursor radiactivo era considerable. Sin embargo, a diferencia de lo que se observaba en las incubaciones con anticuerpo anti-24RNP, no se presentaba degradación del precursor; la mayor parte de éste se mantenía en sin procesarse como una banda de mayor peso molecular que el producto (Figura 15, carril EI). La observación anterior concuerda con lo obtenido en los experimentos realizados con el extracto de procesamiento tratado con el anticuerpo anti-24RNP al que se le agregó la 24RNP recombinante. Al reconstituir este extracto con cantidades incluso bajas de 28RNP (se probó desde 1X), se regeneró la actividad de procesamiento del extracto, equiparándose con el extracto no tratado. Los controles de proteína obtenida de la planta infectada con el virus PVX, no regeneraban procesamiento, ni tampoco el añadir un exceso de 24RNP, la que tampoco interfería al ser añadida junto con la 28RNP, pues aún en presencia de altas concentraciones de 24RNP, la 28RNP era capaz de recuperar el procesamiento (Figura 16).



**Figura 15.** Procesamiento del extremo 3' de *pet D* por un extracto inmunosubstraído de la 28RNP. Autorradiografía a las 24 h del procesamiento del EI, extracto inmunosubstraído de la 28RNP; ES, tratado con suero pre-inmune. Se utilizaron para el procesamiento 20  $\mu$ g de extracto protéico.



**Figura 16.** Reconstitución del extracto inmunosubstraído de la 28RNP. EI, extracto de procesamiento inmunosubstraído con el anticuerpo anti-28RNP (20  $\mu$ g de proteína); 24R, 24RNP recombinante; 28R, 28RNP recombinante; nX, número de veces la concentración de proteína determinada en 20  $\mu$ g de extracto de procesamiento.

## VIII. DISCUSIÓN

### 1. Producción de la 24RNP en un sistema bacteriano

Hasta hace unos años, el sistema utilizado para obtener proteína recombinante, pQE, era una de las mejores opciones ya que posee un represor bastante fuerte que evita la expresión del gen clonado hasta que se induzca con IPTG. La importancia de tener un buen sistema de represión se hace notar sobre todo cuando se trabaja con proteínas como la 24RNP y la 28RNP, que demuestran ser tóxicas y de haber fugas en los vectores de expresión se provocan problemas de muerte celular.

El sistema pQE fue efectivo para la expresión de la 24RNP, más a pesar de obtenerse la proteína deseada en grandes cantidades ante la inducción con IPTG, se tuvo el problema de que la mayor parte de ella se iba a cuerpos de inclusión, como de hecho sucede también con la 28RNP producida en este mismo sistema (Hayes, comunicación personal). La incapacidad de las células bacterianas de mantener esta proteína soluble, podría indicar que por ser una RNP es capaz de alterar las propias funciones de la célula lo que provoca que la bacteria intente deshacerse de ella en cuanto se produce, o a un mecanismo natural por el cual, al detectar grandes cantidades de una proteína la incluye en cuerpos protéicos.

No se trabajó con la proteína de los cuerpos de inclusión debido a que en este trabajo se buscaba establecer la función que desempeña la 24RNP en el procesamiento de los extremos 3' de mRNAs de cloroplasto. El tratar la proteína con altas concentraciones de agentes desnaturizantes, o con detergentes que luego habría que dializar para tratar de recuperar la proteína en su conformación nativa, implicaba el riesgo de no obtener el plegamiento original u obtener una proteína con función modificada. Fue ésta la razón por la que se decidió trabajar sólo con la fracción soluble, aunque ésta fuera limitada.

La etiqueta de histidinas que tiene el vector pQE ayudó ciertamente a la purificación de la proteína que se realizó sin demasiados pasos y de forma relativamente sencilla, obteniéndose con un solo cultivo inducido, más que suficiente para efectuar todos los experimentos.



El principal problema que se presenta al expresar una proteína de eucariote en sistemas bacterianos es que las bacterias no poseen la maquinaria requerida para proveer a la proteína recombinante de las modificaciones post-traduccionales que son en muchos casos necesarias para su funcionamiento *in vivo*. Considerando este aspecto fue que se intentó producir la proteína en un sistema eucariote. Con anterioridad a este trabajo, la 24RNP y la 28RNP habían sido clonadas y expresadas en un sistema de baculovirus con cierto éxito (Abrahamson, comunicación personal) pues a pesar de ser un sistema de expresión bastante controlada, ninguna de las dos proteínas pudieron ser obtenidas en gran cantidad al infectar células de insecto Sf-9. El problema de estas construcciones radicaba en la necesidad de utilizar largos métodos de purificación durante los cuales parte de la proteína se perdía, debido a que esta proteína no se producía con una etiqueta que permitiera su purificación rápida.

Buscando esta ventaja a nivel técnico y un sistema que funcionara para la expresión de gran cantidad de proteínas, se eligió el sistema de levadura *Pichia pastoris* (Clegg *et al.*, 1993). En *Pichia*, se han producido con éxito algunas RNPs como la 33 RNP de tabaco (Hayes, comunicación personal). Sin embargo, al realizar la clonación en este sistema tampoco mostró ser efectivo para producir la 24 ni la 28RNPs de espinaca. La razón por la que las bacterias transformadas en el vector pPICZB y que cargaban el inserto con la forma madura de la 28 o 24RNPs de espinaca no crecían, podría tomarse como un indicio de que son proteínas capaces de alterar en forma importante el metabolismo celular. La 24 y la 28RNPs de tabaco también se intentaron expresar en *Pichia* (Hayes, comunicación personal). En este caso se logró llegar hasta la transformación de la levadura, pero la expresión final de las proteínas resultó ser muy pobre.

Tomando en cuenta estas dificultades, se decidió probar finalmente otro sistema de expresión en plantas: PVX (Ahquist y Pacha, 1990; Chapman, 1991). PVX cuenta con la ventaja de que no se tiene que inducir la expresión, sino clonar en el virus la secuencia del gen que codifica a la proteína deseada, para realizar una transcripción *in vitro* e infectar plantas de *Nicotiana benthamiana* con el transcrito.

PVX por lo general, produce menor cantidad de proteína recombinante que los sistemas de expresión bacterianos o baculovirus, en ocasiones se pueden llegar a tener

problemas con la estabilidad de las construcciones y por tratarse de un virus que infecta a la planta sistémicamente, la infección se va perdiendo conforme la planta crece. Otro de los aspectos que se deben cuidar cuando se trabaja con este virus es que es muy agresivo y capaz de infectar a gran número de especies, por lo que las condiciones de manejo deben ser sumamente controladas. A diferencia de los otros sistemas que se pueden manejar en el laboratorio, es un poco más lento ya que hay que esperar a que las plantas presenten los síntomas de infección, lo que puede demorar entre 15 días y un mes.

PVX parecía ser el sistema que podría funcionar para las proteínas que se deseaban sobreproducir, más en el caso de la 24RNP, no se logró la obtención del transcrito necesario para la infección, a pesar de que se repitió en varias ocasiones el experimento. Las causas de estos resultados negativos, no pudieron determinarse. Pudo tratarse de un problema en el momento de realizar la transcripción *in-vitro*.

Por ello hubo que trabajar con la proteína producida en bacteria y para intentar cubrir las modificaciones post-traduccionales, se incubó la proteína recombinante en un extracto de cloroplastos de espinaca recién lisados e incubados con luz. Esta estrategia se formuló considerando que la probabilidad de que las enzimas encargadas de las modificaciones post-traduccionales se encontraran en el extracto era alta, ya que finalmente esta proteína a pesar de ser codificada en el núcleo es en el cloroplasto donde ejerce su función. Se sabe además que para la 28RNP la cinasa responsable de su fosforilación es una cinasa cloroplástica. Sin embargo debe mencionarse que no se comprobó que la 24RNP se hubiera modificado con el tratamiento dado ni se puede descartar la posibilidad de que una eventual modificación se lleve a cabo fuera del cloroplasto. Después de la incubación se re-purificó la proteína y fue ésta la que se empleó en la mayoría de los experimentos de reconstitución.

## **2. Producción en PVX y purificación de la 28RNP recombinante.**

La 28RNP se tenía clonada en pQE y su expresión era perfectamente factible. Sin embargo, por los experimentos realizados en el laboratorio del Dr. Schuster, se sabía que esta proteína para ser funcional, requería de modificaciones post-traduccionales

(fosforilación) (Lisitsky y Schuster, 1995), mismas que no pueden realizarse en el sistema de expresión bacteriano. Por ello se probaron varias técnicas para lograr la expresión en un sistema eucariote.

Por suerte, a pesar de no lograrse tampoco la expresión en levadura ni en baculovirus, si logró expresarse en el sistema de PVX. Se infectaron con la construcción PVX-28RNP dos plantas de *Nicotiana benthamiana*. Como se comentó en resultados, este sistema funcionó para la purificación de la proteína recombinante, más no por ello dejó de presentar ciertas complicaciones, pues la primera planta infectada con la construcción produjo en buenos niveles la proteína, pero sufrió retraso en su crecimiento y síntomas de enfermedad aguda que llevaron a la muerte un mes después de la inoculación. Las plantas infectadas con el virus PVX forma silvestre, presentaron los mosaicos característicos de este virus, más no llegaron al grado de una enfermedad tan severa que provocara la muerte de la planta.

La segunda planta infectada tuvo niveles de expresión más bajos, lo que ayudó a que se mantuviera por mayor tiempo viva; esto permitió obtener mayor cantidad de tejido para hacer la purificación de la proteína. Al realizar el fraccionamiento y separar las membranas de las proteínas solubles, resultó que la mayor parte de la proteína producida se encontraba en la fracción membranal. La razón por la que se dió esta localización, es porque el virus se replica asociado a retículo endoplásmico y se encuentran coordinados los procesos de replicación, transcripción y traducción.

Se probaron técnicas de solubilización con altas concentraciones de sales y bajas de detergentes. A concentraciones altas de LiCl, parte de la proteína logra solubilizarse. Finalmente no se trabajó con esta fracción porque no hubo necesidad ante la abundancia de tejido, pero es una técnica que de ser necesaria puede emplearse con éxito, ya que las sales son fáciles de eliminar por diálisis, (aunque siempre es preferible el trabajar con fracciones de proteína soluble ya que se ha observado para la 28RNP que la fracción insoluble contiene proteína no funcional) (Hayes, comunicación personal).

Gracias a que la construcción poseía ya la etiqueta de histidinas, la purificación fue rápida por columna de resina de Ni.

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

### **3. Purificación del anticuerpo anti-24RNP.**

El problema de la reacción cruzada que tiene este anticuerpo con la 28RNP no pudo resolverse a pesar de intentarse la limpieza por columnas de afinidad montadas con la 24 y 28RNPs recombinantes. No fue la primera vez que se había tratado de obtener una purificación de éste anticuerpo sin éxito (Loza-Tavera, comunicación personal), lo que lleva a pensar que por la semejanza entre estas dos proteínas, es difícil obtener anticuerpos contra la 24RNP exclusivamente si se utiliza para generar el anticuerpo la secuencia de la proteína madura. Para la 28RNP se consiguió un anticuerpo sin reacción cruzada, el cual había sido generado en contra del dominio ácido de la proteína, que es notablemente diferente entre todas las RNPs de cloroplasto. Sin embargo, la obtención de estos anticuerpos no fue sencilla, pues el dominio ácido es una región muy pequeña y posteriormente, la limpieza del anticuerpo empleando una columna de afinidad presentó algunas complicaciones tales como romper las interacciones con el antígeno al que reconoce con gran especificidad y presenta además una fuerte afinidad (Phyare, comunicación personal). Para la 24RNP no se ha generado un anticuerpo contra su dominio ácido debido a que es todavía más pequeño que el dominio de la 28RNP.

### **4. Experimentos de reconstitución del extracto tratado con anticuerpo anti 24RNP.**

No obstante que no se logró obtener un extracto inmunosubstraído con anticuerpos anti -24RNP por la técnica de acoplamiento a proteína A, la incubación directa demostró ser eficiente para alcanzar el objetivo planteado: analizar el efecto de secuestrar la 24RNP del extracto de procesamiento de cloroplastos de espinaca. Si bien este anticuerpo secuestra tanto la 24 como la 28RNPs, el uso de un extracto de procesamiento sin la 28 y con la 24RNP sirvió para confirmar resultados.

Metodológicamente, la cantidad extra de proteína agregada en forma de anticuerpo, demostró no alterar la capacidad del extracto de espinaca para procesar correctamente, pues se obtuvo el producto estable cuando se incubó con suero pre-inmune (Figura 6).

En los experimentos de procesamiento, se demostró que los efectos de degradación que se observaban al incubar con concentraciones de anticuerpo de 1:4000 o superiores, no se debía a la presencia de RNAsas en el anticuerpo, pues éste al ser incubado con el precursor en ausencia de extracto de procesamiento no lo alteraba. Lo mismo era observado en una incubación con el suero pre-inmune. El extracto además era capaz de procesar a concentraciones de suero preinmune de hasta 1:1000. Por ello, el que el precursor no fuera procesado y se degradara, debía estar relacionado con la falta de la 24RNP, la 28RNP o ambas proteínas.

Western blots con diluciones de las proteínas recombinantes purificadas, en comparación con la intensidad de señal obtenida en 20 µg de extracto de procesamiento, permitieron determinar las cantidades de la 24 y 28RNPs presentes en el extracto. Igualmente se implementaron dos controles importantes: las proteínas aisladas de una columna de Ni-NTA a la concentración de elución de imidazol 0.1 M (que fue donde se despegó la 28RNP) y un control de una proteína de *E. coli* expresada con una etiqueta de histidinas y sin propiedades de unión a RNA. Estos controles demostraron que los resultados obtenidos en las reconstituciones con proteínas recombinantes no se debían ni a que la proteína tuviera histidinas extras, ni a que se tratara de proteínas cuya expresión se inducía en la planta de *Nicotiana benthamiana* ante la infección del virus y co-purificaran durante la elución por gradiente de imidazol.

Los experimentos de reconstitución con las proteínas recombinantes se montaron considerando que se agregarían en exceso, pues al tener el anticuerpo presente en el ensayo, éste se encontraba aún en posibilidad de atrapar la proteína añadida.

No se detectó recuperación de la actividad de procesamiento al añadir la 28RNP recombinante al extracto depletado de la 28 y la 24RNPs, en concentraciones de 2 y 5 veces la cantidad presente en el extracto: se seguía observando degradación. Sin embargo incrementando a 10 veces, el procesamiento se recuperaba. El incrementar más la concentración (hasta 30 veces) no parecía aumentar más la procesividad. Al realizar las reconstituciones con el respectivo control (PVX-0.1 M), éste no recuperaba procesamiento ni a altas ni a bajas concentraciones.

El añadir al extracto la 24RNP ya fuera incubada en el extracto de cloroplastos lisados y con luz o tan sólo purificada de la bacteria, no representó cambios en el resultado, (por ello en la mayor parte de los casos se trabajó con proteína tratada en el extracto cloroplástico). Los resultados indicaron que a concentraciones de hasta 20X, no se tenía efecto sobre el extracto inmuno-substraído, éste seguía degradando: el agregar la 24RNP no recuperaba la capacidad de procesamiento como lo hacía la 28 y el RNA seguía siendo degradado. Más, cuando se incrementó a 30X se observó un efecto diferente: el precursor no era degradado, aunque tampoco procesado. El mismo efecto se tuvo con concentraciones de 50X, 75X, 100X y 500X.

Podría pensarse que una concentración de 100X estaría interfiriendo con el procesamiento por cantidad de proteína añadida. Sin embargo, como lo demostró tanto el control de la proteína farnesil transferasa subunidad alfa a esa concentración (control His tag), como el añadir 100 X de 24RNP y posteriormente 15 X de la 28RNP, el extracto era capaz de procesar al estar presente la 28RNP.

El que para observar un efecto de la 24RNP haya sido necesario agregar altas concentraciones de esta proteína podría indicar que esta requiere de modificaciones post-traduccionales que, o bien no se hayan realizado, o sólo una pequeña cantidad de la proteína incubada en el extracto de cloroplastos y re-purificada las haya adquirido. Otra posibilidad es que por ser poca la proteína recombinante soluble, parte de la que fue purificada en realidad formara parte de cuerpos de inclusión donde la proteína no tuviera la conformación que la hiciera activa, y por ello sólo una parte de la proteína purificada resultara funcional.

Con estos experimentos se podría sugerir que la función de la 24 y 28RNPs durante el procesamiento de mRNAs no es la misma. Los resultados obtenidos con el extracto inmunosubstraído de la 28RNP, hicieron posible confirmar esta idea.

## **5. Experimentos de reconstitución del extracto inmunosubstraído de la 28RNP.**

Este extracto fue de gran utilidad para poder diferenciar más claramente entre el efecto de substraer del extracto una o las dos RNPs.

Se verificó por western blots que durante la inmunosubstracción con el anticuerpo contra la 28RNP sólo se hubiera retirado una de las dos proteínas. Además de la 24RNP, también la 33 RNP (cuya función todavía se desconoce, pero se ha propuesto que podría jugar un papel importante en la regulación de las nucleasas que forman parte del complejo de alto peso molecular encargado del procesamiento de los extremos 3' de mRNAs en el cloroplasto) (Hayes *et al.*, 1996) se encontraba presente.

Aún con este análisis, no se puede descartar la posibilidad de que otras proteínas que no sean RNPs hayan quedado asociadas a la 28RNP y substraídas del extracto. Aún no se sabe de las interacciones que pudiera establecer la 28RNP con otras proteínas dentro del extracto de procesamiento.

Al probar el extracto inmunosubstraído en el ensayo de procesamiento, lo que se observó fue un efecto diferente al que se tuvo con la incubación con anticuerpo anti 24RNP: el precursor casi no se procesaba a una forma estable de menor tamaño, pero tampoco se degradaba.

El que no se perdiera totalmente la capacidad de procesamiento puede pensarse que se debe a que ninguna inmuno-substracción funciona al 100 %, y aunque no se detecte por western, puede ser que quede algo de 28RNP en el extracto. Además, en experimentos hechos en *Arabidopsis* con plantas transgénicas que llevan construcciones anti-sentido de la 28RNP y ésta no se detecta en un análisis por western blot, se observa que las plantas presentan un fenotipo idéntico al silvestre lo que apuntaría a que en condiciones de procesamiento óptimas se requiere de muy poca cantidad 28RNP para lograr un procesamiento correcto de mensajes importantes para el funcionamiento del cloroplasto (Phayre, comunicación personal).

Cabe hacer notar sin embargo, que los resultados encontrados por Schuster y Gruissem (1991) al inmunosubstraer el extracto de procesamiento de la 28RNP difieren de los obtenidos en este trabajo, ellos observaron degradación del RNA radiactivo en vez de no procesamiento. Esta diferencia en resultados puede deberse a que al extracto inmunosubstraído por Schuster y Gruissem no sólo se le quitó la 28RNP sino también la 24RNP y la reconstitución se hizo con una fracción proteica que contenía también la 24RNP.

El que no se requiera de cantidades altas de 28RNP para que el extracto sea capaz de procesar se comprobó haciendo la reconstitución con cantidades tan bajas como 0.1X. Como en este extracto no se tenía el problema de secuestro de la proteína por el anticuerpo durante el ensayo de procesamiento *in vitro*, se tuvo una recuperación de la actividad de procesamiento a cantidades más bajas de proteína recombinante agregada. Un exceso de proteína recombinante, no modificaba los resultados en comparación a lo obtenido con cantidades menores.

El control de PVX o la 24RNP purificada, ni a concentraciones altas ni bajas modificaba el patrón de no procesamiento- no degradación del extracto inmunosubstraído con el anti-24RNP.

#### **6. La 24RNP está involucrada en la determinación de la estabilidad de los mensajes de cloroplasto.**

Las estructuras tallo-asa que se forman en la región 3' de los mRNAs de cloroplasto pueden funcionar como una barrera al ataque de nucleasas (Stern y Grusissem, 1987), sin embargo, la formación de estas estructuras no es suficiente para la estabilización de los extremos 3' de los mensajes del cloroplasto y se sabe que, proteínas codificadas en el núcleo que se unen a esta región desempeñan un papel importante en este proceso (Schuster y Grusissem, 1991). La 28RNP puede dirigir el procesamiento correcto llevado a cabo por el complejo de alto peso molecular que ha sido aislado del cloroplasto. Una posibilidad que ha sido planteada es que esta proteína interaccione con el complejo vía su dominio ácido y ayude a colocarlo en el RNA abajo de la estructura tallo-asa para iniciar el corte endo nucleolítico y el procesamiento correcto del externo. La posibilidad de que la 28RNP defina el sitio de corte o bien que su función sea detener el avance de las exo-nucleasa (PNPasa) queda por esclarecerse.

Con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo, se vislumbra una función diferente para la 24RNP. La 24RNP parece estar relacionada con la estabilización general del mensaje. La manera como estaría dada esta estabilidad podría ser a través de regular la



actividad de exonucleasas, ya sea por interacción con ellas o por unión a regiones de RNA protegiéndolas de la acción degradativa.

Quedan por estudiar las interacciones que se establecen durante el procesamiento entre proteínas del complejo. Tomando en consideración los resultados obtenidos en este trabajo, sería interesante probar la hipótesis de interacción de la p67 (endonucleasa del complejo de alto peso molecular) con la 28RNP si es que el primer corte para generar el extremo maduro en realidad lo hace la p67 (Hayes *et al.*, 1996). Bajo este marco, otra posibilidad sería la interacción de la 24RNP con exo-nucleasas, que en el marco de lo que se conoce podría ser la 100RNP o si la interacción no es directa, tal vez con la 33RNP que parece estar regulando a la exonucleasa.

El conocer más a cerca de las interacciones que se establecen entre las RNPs del extracto de procesamiento ayudará a definir mejor como funciona la maquinaria de procesamiento de RNA en el cloroplasto.

## X. PERSPECTIVAS

En este apartado menciono algunas posibilidades de desarrollo futuro de esta línea de investigación a partir de los resultados obtenidos en mi trabajo experimental.

En este trabajo se planteó el investigar si en base a la similitud estructural que presentan la 24 y la 28RNPs, cabría la posibilidad de que ambas proteínas desempeñaran una función semejante durante el procesamiento y estabilización de los mRNAs de cloroplasto. Los resultados obtenidos en los experimentos de reconstitución parecen indicar que la función de ambas proteínas es diferente, lo que podría conducir a pensar que sus diferencias, más que sus semejanzas, son importantes para su funcionamiento. Se podría sugerir, como anteriormente se hizo, que el dominio ácido de estas proteínas pudiera ser importante en cuanto a regulación de la proteína *per-sé* y su interacción con otras proteínas.

Para los experimentos de reconstitución se utilizó la 24RNP de espinaca recombinante producida en bacteria teniendo que emplearse grandes cantidades de proteína para observar una función. El empleo de estas cantidades, a pesar de que no son fisiológicas, puede atribuirse a que el anticuerpo se encontraba aún presente en la reacción y secuestraba también a la 24RNP recombinante que era agregada durante la reconstitución. Otra posibilidad es que la proteína recombinante producida en bacteria fuera solo parcialmente funcional debido a algun problema de plegamiento al momento de ser producida en la bacteria. Para mejorar estos ensayos, sería conveniente trabajar sin el anticuerpo presente, es decir, tratar de repetir la inmunoprecipitación para eliminar la 24RNP por completo del extracto de procesamiento y por otro lado, emplear proteína recombinante producida en un sistema eucariote con lo cual sería mas factible que la proteína recombinante tuviera la estructura correcta y tambien las modificaciones post-traduccionales pertinentes. En este sentido nuestro intento de emplear el sistema de expresión en virus PVX fue efectivo para producir la 28RNP y a pesar de que no se lograron resultados satisfactorios para la 24RNP, podría volver a intentarse repitiendo la construcción generada a partir de la clona original de cDNA de hoja de espinaca. De obtenerse la 24RNP recombinante podría emplearse también para analizar si la 24RNP tiene o no modificaciones post-traduccionales que la hagan activa. Así mismo, podría establecerse si la proteína generada en bacteria es o no funcional por

comparación con la proteína generada en el sistema eucariote lo que podría escalarecer si la alta cantidad de proteína que se debió agregar a los ensayos de reconstitución llevados a cabo en este trabajo se deben al problema de tener proteína recombinante no activa.

Por otro lado, cabe la posibilidad de que el efecto de la 24RNP observado, es decir, el de proteger al precursor de RNA de una degradación, sea un efecto inespecífico de protección debido a la capacidad de los dos dominios de unión a RNA de la 24RNP de unirse al precursor. Para descartar esta posibilidad sería interesante probar si es posible generar el mismo efecto utilizando otra de las RNPs presentes en el sistema (como la 33 RNP por ejemplo) o una RNP ajena a él, por ejemplo alguna RNP de mamífero. Este experimento no pudo llevarse a cabo debido que no se contaba con otra RNP purificada del extracto de cloroplasto ni con alguna otra que pudiera usarse como control.

Por otro lado, sería muy ventajoso tener un anticuerpo específico que reconociera solamente a la 24RNP sin que tuviera ninguna reacción cruzada con la 28RNP. La reacción cruzada con la 28RNP parecería factible de evitar si se generaran anticuerpos contra el dominio ácido de la 24RNP, sin embargo hay que considerar que esto no es sencillo sobre todo por el hecho de que el dominio ácido de la 24RNP es de menor tamaño que el de la 28RNP (fue muy difícil obtener y purificar el anticuerpo generado contra el dominio ácido de la 28RNP) (Phyare, 1998 comunicación personal).

Sería muy recomendable realizar los experimentos de reconstitución sin tener el anticuerpo anti-24RNP presente, para ello buscaría realizar la inmunosubstracción de alguna otra manera más eficiente.

En lo que respecta a la incubación de la proteína bacteriana recombinante en el extracto de cloroplastos recién lisados y en presencia de luz, con el objetivo de que se llevaran a cabo modificaciones post-traduccionales que fueran importantes para la proteína, no se tiene la certeza de que éstas se hayan efectuado. Queda por investigar si el tratamiento fue o no efectivo en este sentido. En una primera aproximación a este problema, podría incorporarse al ensayo ATP marcado con  $^{32}\text{P}$  para identificar si la proteína es fosforilada bajo esas condiciones. En caso de no detectarse fosforilación alguna en la 24RNP, podría probarse con un extracto total de hojas de espinaca, pues como se mencionó con anterioridad, existe la posibilidad de que las enzimas capaces de modificar a la proteína no

sean cloroplásticas, sino citoplásmicas. En caso de detectarse fosforilación sería importante identificar los residuos fosforilables y el efecto de la modificación sobre las propiedades de la proteína (tenemos por ejemplo que para la 28RNP, la modificación post-traducciona que sufre, cambia su afinidad por el RNA y podría también estar involucrada en regular interacciones proteína-proteína) (Lisitsky y Schuster, 1995). Otra opción que puede investigarse es el que se presente una glicosilación como modificación post-traducciona de la 24RNP.

En cuanto a determinar si existen interacciones proteína-proteína entre los componentes del extracto de procesamiento, el sistema de doble-híbrido de levadura ha sido probado con la 28RNP para hacer un escrutinio y determinar que proteínas interaccionan. Sin embargo, no fue posible conseguir resultados satisfactorios pues se obtienen muchos falsos positivos (Phayre, 1998, comunicación personal). Quedaría la posibilidad de emplear métodos bioquímicos como el entrecruzamiento con agentes químicos.

Una de las diferencias que existen entre la 24 y la 28RNP es su patrón de distribución durante las diferentes etapas del desarrollo de la planta. La 24RNP se ha encontrado en mayor abundancia en hojas jóvenes de espinaca, en tanto que la 28RNP es más abundante en hoja madura (Abrahamson, no publicado). Así, sería interesante ver si la función de cada una de estas proteínas no varía a lo largo del desarrollo de la planta o a que se debe la diferencia en su abundancia relativa.

Otro enfoque interesante a analizar es probar, en experimentos de procesamiento *in-vitro*, diferentes extremos 3' de mensajes cloroplásticos, cuya abundancia varíe a diferentes etapas de desarrollo del cloroplasto, de modo que se pueda establecer si el procesamiento de esos mensajes es o no efectivo en presencia o ausencia de la 24 y/o 28RNPs. Para este primer estudio sólo se utilizó como RNA molde el extremo 3' de *petD* que es un mensaje cuya cantidad relativa no varía considerablemente a lo largo del desarrollo del cloroplasto y los resultados no necesariamente son extrapolables a todos los mensajes.

Finalmente en los laboratorios del Dr. Guissem y de la Dra. Loza Tavera se han generado líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* con la 28 y 24RNPs sobre-expresadas o en antisentido. Estas plantas serán de gran utilidad para el estudio de la función de estas proteínas pues entre otras cosas, además de los posibles fenotipos característicos que se

obtuvieran en las plantas, podrían prepararse a partir de ellas extractos de procesamiento que fueran evaluados en su capacidad de procesar diferentes moldes y en experimentos de reconstitución que darían resultados más claros.

Estos experimentos vendrían a redondear el panorama que se tiene hasta el momento sobre la importancia de estas dos pequeñas RNPs en el procesamiento de los mRNAs plastídicos.

## X. CONCLUSIONES.

1) A pesar de su semejanza estructural, la 24RNP y la 28RNP parecen tener funciones diferentes dentro del proceso de generación del extremo 3' maduro del mensaje de *petD*.

2) Se confirmó que la 28RNP desempeña un papel importante en la generación del extremo 3' maduro del mensaje de *petD* definiendo un sitio de corte para una nucleasa o bien impidiendo el paso de una exonucleasa más allá de la estructura tallo-asa.

3) La 24RNP no es necesaria para establecer el sitio correcto de corte. Su función parece estar más relacionada con dar estabilidad general a los mRNAs.

## XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Abler ML and Green P. 1996.** Control of mRNA stability in higher plants. *Plant Mol. Biol* 32: 63-78.
- Abrahamson S, Roell M, Tam H, Schuster G and Gruissem W.** (no publicado).  
Isolation, cDNA cloning and characterization of a 24 kDa ribonucleoprotein from spinach chloroplast.
- Abrahamson S. 1995.** Comunicación personal.
- Adams CC and Stern DB. 1990.** Control of mRNA stability in chloroplasts 3' inverted repeats: effects of stem and loop mutations on degradation of *psbA* mRNA *in vivo*. *Nucl. Acids Res.* 18: 6003-6010.
- Albá M and Pagés M. 1998.** Plant proteins containing the RNA-recognition motif. *TIPS* 3 (1): 15-21
- Bandziulis RJ, Swanson M and Dreyfuss G. 1989.** RNA binding proteins as developmental regulators. *Genes and Dev.* 3: 431-437.
- Barkan A. 1988.** Proteins encoded a complex chloroplast transcription unit are each translated from monocistronic and polycistronic RNA. *EMBO J.* 7: 2637-2644.
- Bendich AJ. 1987.** Problems and paradigms. *Bio Essays* 6: 279-282.
- Causton H, Pand B, McLaren RS and Higgins CF. 1994.** mRNA degradation in *Escherichia coli*: a novel factor which impedes the exoribonuclease activity of PNPase at stem-loop structures. *Molec. Microb.* 14 (4) 731-741.
- Cohen SN. 1995.** Surprises at the 3' end of prokaryotic RNA. *Cell* 80, 829-832.
- Cook WB and Walker JC. 1992.** Identification of a maize nucleic binding protein (NBP) belonging to a family of nuclear encoded chloroplast proteins. *Nuc. Acids Res.* 20: 359-364.
- Chapman SN. 1991.** A molecular analysis of potato virus X. PhD. Thesis. Cambridge University.
- Chapman SN, Kavanagh T and Baulcombe D. 1992.** Potato Virus X as a vector for gene expression in plants. *Plant J.* 2, 549-557.
- Chen HC and Stern DB. 1991.** Specific ribonuclease activities in spinach chloroplast promote mRNA maturation and degradation. *J. Biol. Chem.* 266: 24205-24211.
- Deng XW, Stern DB, Tonkyn JC and Gruissem W. 1987.** Plastid run-on transcription: application to determine the transcriptional regulation of spinach plastid genes. *J. Biol. Chem.* 262: 9641-9648.
- Deng XW and Gruissem W. 1987.** Control of plastid gene expression during development in non-photosynthetic plastids of higher plants. *EMBO J.* 7: 3301-3308.
- Deng XW and Gruissem W. 1988.** Constitutive transcription and regulation of gene expression during development: the limited role of transcriptional regulation. *Cell* 49: 379-387.
- Fukami KK, Tomoda S and Go M. 1993.** Evolutionary clustering and functional similarity of RNA-binding proteins. *FEBS lett.* 335: 289-293.
- Gruissem W and Zurawski G. 1985.** Identification and mutational analysis of the promoter for a spinach chloroplast transfer RNA gene. *EMBO J.* 4, 1637-1644.

- Gruissem W, Elsner-Menzel C, Latshaw S, Narita JO, Schaffer MA and Zurawski G. 1986a.** A subpopulation of spinach chloroplast tRNA genes does not require upstream elements for transcription. *Nucleic Acids Res.* 14(19), 7541.
- Gruissem W, Greenberg BM, Zurawski G and Hallick R. 1986.** Chloroplast gene expression and promoter identification in chloroplast extracts. *Methods in Enzymol.* Vol 118: 253-271.
- Gruissem W, Barkan A, Deng XW and Stern D. 1988.** Transcriptional and post transcriptional control of plastid mRNA levels in higher plants. *TIG* Vol.4: 9: 258-263.
- Gruissem W. 1989a.** Chloroplast gene expression: how plants turn their plastids on. *Cell* 56: 161-170.
- Gruissem W. 1989b.** Chloroplast RNA: transcription and processing. *In* The biochemistry of plants. Academic Press Vol. 15: 151-191.
- Gruissem W and Schuster G. 1993.** Control of mRNA degradation in organelles. *In* : Control of mRNA Stability. Brawerman G and Belasco J (Eds) Academic Press, Orlando FL, 329-345.
- Harlow D and Lane D (Eds). 1989.** Antibodies, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Lab. 584 pp.
- Hayes R. 1998.** Comunicación personal
- Hayes R, Kudla J, Schuster G, Gabay L, Maliga P and Gruissem W. 1996.** Chloroplast mRNA 3' end processing band a high molecular weight protein complex is regulated by nuclear encoded RNA binding proteins. *EMBO J.* 15 (5) 1132-1141.
- Herrmann RG, Westhoff J, Titgen J and Nelson N. 1985.** Thylakoid membrane proteins and their genes. *In*: Molecular function of the plant genome. van Volten-Doting GS, Groot P and Hall T (Eds) Londres p. 233-256.
- Huang H, Liao J and Cohen S. 1998.** Poly(A) and poly (U) specific RNA 3' tail shortening band *E. coli* RNase E. *Nature* 391: 99-102.
- Hsu-Ching C and Stern D. 1991.** Specific binding of chloroplast proteins *In vitro* to the 3' untranslated region of spinach chloroplast *petD* mRNA. *Mol. Cell. Biol.* 4380-4388.
- Igloi GL and Kossel H. 1992.** The transcriptional apparatus of chloroplasts. *Crit. Rev. Plant. Sci.*, 19 (6) 525-536.
- Kaneketsu M, Akiyoshi E, Nakamura T and Ohtsuki K. 1995.** Chloroplast ribonucleoproteins (RNPs) as phosphate acceptors for casein kinase II. *Plant Cell Phys.* 36(8) 1649-1656.
- Keenan DJ, Querand CC and Keene JD. 1991.** RNA recognition: towards identifying determinants of specificity. *TIBS* 16, 214-220.
- Klaff P and Gruissem W. 1991.** Changes in chloroplast mRNA stability during leaf development. *Plant Cell* 3: 517-529.
- Klein RR and Mullet JE. 1987.** Control of gene expression during higher plant chloroplast biogenesis. Protein synthesis and transcription levels of *PsbA*, *psaA-psaB* and *rbcL* in dark-grown and illuminated barley seedlings. *J. Biol. Chem.*, 265 (4), 1895-1906.
- Krupinska K and Apel K. 1989.** Light induced transformation of etioplasts to chloroplasts of barley without transcriptional control of plastid gene expression. *Mol. Gen. Genet.* 219: 467-473.



- Laemmli UK. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Li Y and Sugiura M. 1990.** Three distinct ribonucleoproteins from tobacco chloroplast: each contains a unique amino terminal acidic domain and two ribonucleoprotein consensus motifs. *EMBO J.* 9: 3059-3066.
- Lisitsky I and Schuster G. 1995.** Phosphorylation of a chloroplast RNA-binding protein changes its affinity to RNA. *Nuc. Acids Res.* 23 (13) 2506-2511.
- Lisitsky I, Liveanu V and Schuster G. 1995.** RNA binding characteristics of a ribonucleoprotein from spinach chloroplast. *Plant Phys.* 107: 933-941.
- Littauer UZ and Soreq H. 1982.** Polynucleotide phosphorylase. *In: The Enzymes.* Academic Press NY, Boyer PD (Ed) Vol. 15 p. 517-553.
- Loza-Tavera, H. 1996.** Comunicación personal.
- Mc Dowalld KJ, Kaberdin VR, Wu WS, Cohen S and Lin-chao S. 1995.** Site specific RNase E cleavage of oligonucleotides and inhibition of stem-loops. *Nature* 374. 287-290.
- Mullet JE. 1988.** Chloroplast development and gene expression. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39: 475-502.
- Mullet JE. 1993.** Dynamic regulation of chloroplast transcription. *Plant Phys.* 103: 309-313.
- Otha M, Sugita M and Sugiura M. 1995.** Three types of nuclear genes encoding chloroplast RNA binding proteins (cp29, cp31 and cp33) are present in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 27: 529-539.
- Palmer JD. 1990.** Contrasting modes of genome evolution in land plants organelles. *Trends Genet.* 6: 115-120.
- Phyare D. 1998.** Comunicación personal.
- Rapp JC, Baumgartner BJ and Mullet JE. 1992.** Quantitative analysis of transcription and RNA levels of 15 barley chloroplast genes. *J. Biol. Chem.* 267: 21404-21411.
- Rock CD, Barkan A and Taylor WC. 1987.** The maize plastids *psbB-psbF-petB-petD* gene cluster. *Curr. Genet.* 12: 69-77.
- Rochaix JD. 1996.** Post-transcriptional regulation of chloroplast gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol. Biol.* 32: 327-341.
- Rott R, Liveanu V, Drager R, Stern D and Schuster G. 1998.** The sequence and structure of the 3' untranslated regions of chloroplast transcripts are important determinants of mRNA accumulation and stability. *Plant Mol. Biol.* 36: 307-314.
- Sexton TB, Christopher DA and Mullet JE. 1990.** Light induced switch in barley *psbD-psbC* promoter utilization: a novel mechanism regulating chloroplast gene expression. *EMBO J.* 9 (13) 4483-4494.
- Schuster G and Gruissem W. 1991.** Chloroplast mRNA 3' end processing requires a nuclear encoded RNA binding protein. *EMBO J.* 10: 1493-1502.
- Siomi H and Dreyfuss G. 1997.** RNA binding proteins as regulators of gene expression *Curr. Opin. in Genet. and Dev.* 7 (3) 345-353.
- Stern DB and Gruissem W. 1987.** Control of plastid gene expression: 3' inverted repeats act as mRNA processing and stabilization elements but do not terminate transcription. *Cell*, 51, 1145-1157.

- Stern DB and Gruissem W. 1989.** Chloroplast mRNA 3' end maturation is biochemically distinct from procaryotic mRNA processing. *Plant Mol. Biol.* 13: 615-625.
- Stern DB and Kindle K. 1993.** 3' End maturation of *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast *atpB* is a two step process. *Mol. Cell. Biol.* 13: 2277-2285.
- Sugita M and Sugiura M. 1996.** Regulation of gene expression in chloroplast of higher plants. *Plant Mol. Biol.* 32: 315-326.
- Sugiura M. 1992.** The chloroplast genome. *Plant Mol. Biol.* 19: 149-168.
- Taylor WC. 1989.** Regulatory interactions between nuclear and plastid genomes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 211-233.
- Tonkyn JC, Deng XW and Gruissem W. 1992.** Regulation of plastid gene expression during photooxidative stress. *Plant Phys.* 99, 1406-1415.
- Westhoff P and Herrmann G. 1988.** Complex RNA maturation in chloroplast. The *psbB* operon in spinach. *Eur. J. Biochem.* 171: 551-564.
- Yang J, Schuster G and Stern DB. 1996.** CSP41, A sequence specific mRNA binding protein is an endoribonuclease. *Plant Cell* 8, 1409-1420.
- Zurawski G and Clegg MT. 1987.** Evolution of higher plant chloroplast DNA-encoded genes: implication for structure-function and phylogenetic studies. *Annu. Rev. Plant Phys.* 38, 391-402.