



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

Indagaciones sobre la posible función de
La proteína CLA1 de *Arabidopsis thaliana*

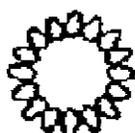
TESIS

QUE PRESENTA

GABRIELA PEDRERO HERNÁNDEZ

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

0274270



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CUERNAVACA, MORELOS 1999



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.

INDICE

Presentación	- 1 -
Introducción	- 2 -
Fotosíntesis	- 2 -
Mecansmo de carboxlación y síntesis de glucosa	- 4 -
Fijación de CO ₂ vía C ₄	- 5 -
Metabolismo ácido de las crasuláceas	- 6 -
Los plástidos	- 7 -
Origen evolutivo de los cloroplastos	- 8 -
Desarrollo de los cloroplastos	- 8 -
Factores ambientales que influncian la el desarrollo y funcionamiento del aparato fotosintético	
Transporte de proteínas al cloroplasto	- 10 -
Enzimas que unen tiamina difosfato	- 11 -
<i>Locus</i> similar a CLA1 en <i>Rhodobacter capsulatus</i> .	- 11 -
Antecedentes	- 14 -
Hipótesis y objetivos	- 16 -
Estrategia experimental	- 17 -
Resultados	
Análisis de la secuencia.	- 18 -
Obtención de la proteína CLA1	- 21 -
Inmunodetección de CLA1 mediante ensayos tipo Western	- 23 -
Discusión	- 25 -
Localización de CLA1	- 25 -
CLA1 en el desarrollo de la planta	- 26 -
CLA1 en distintos tejidos de <i>Arabidopsis</i>	- 26 -
Proteínas similares a CLA1 en otros organismos	- 26 -
Hacia la función de CLA1	- 27 -
Perspectivas	- 28 -
Apéndice A	- 29 -
Apéndice B	- 30 -
Bibliografía	- 34 -

PRESENTACIÓN

El avance en el conocimiento sobre los principios genéticos y bioquímicos nos permite estudiar procesos biológicos como la fotosíntesis. En la actualidad se sabe cuales son las moléculas involucradas en la captación de luz por las plantas y hay datos abundantes acerca de los mecanismos mediante los cuales se realiza este proceso. Sin embargo, aún no están completamente claros los diferentes pasos involucrados en el desarrollo del sistema fotosintético.

En el proyecto de investigación que aquí se describe se utilizó una mutante de *Arabidopsis thaliana* llamada *clal-1*, que es una planta albina incapaz de realizar la fotosíntesis ya que carece de cloroplastos desarrollados (Mandel *et al.*, 1996). El gen fué clonado y secuenciado (Pedrero, 1994; Mandel *et al.*, 1996), y en este trabajo se analizó la secuencia predicha de los aminoácidos de *CLA1* utilizando programas computacionales diseñados para el análisis de bancos de secuencias protéicas.

Con el fin de encontrar si *CLA1* se localiza en cloroplasto, y buscar en que estados de desarrollo de la planta se encuentra presente, se sobreexpresó *CLA1* en el vector pGEX-3 de *Escherichia coli* y se obtuvieron anticuerpos contra la proteína *CLA1*. También se utilizaron tales anticuerpos para buscar la expresión de *CLA1* en tejido de raíz, y en plantas con distinto tipo de metabolismo fotosintético. Finalmente se realizó un ensayo para la detección de alguna proteína relacionada a *CLA1* en *Rhodobacter capsulatus* (bacteria fotosintética), en *Escherichia coli* y en *Saccharomyces cerevisiae*.

El análisis de la secuencia nos ha permitido encontrar similitud de *CLA1* con enzimas dependientes de tiaminadifosfato (TPP), principalmente con las transcetolasas. En los bancos de secuencias se encontraron secuencias peptídicas homólogas a *CLA1* en otras plantas, en una cianobacteria, en dos bacterias fotosintéticas y en algunas eubacterias. No se encontró un gen homólogo en levadura.

Recientemente se describió un gen homólogo a *CLA1* que codifica para una nueva clase de transcetolasas (Sprenger *et al.*, 1997, Lois *et al.*, 1998 y Lange *et al.*, 1998). Una de ellas está codificada en el marco de lectura *f620* de *E.coli* (Lange *et al.*, 1998) y es parte de una vía metabólica independiente de mevalonato para la síntesis de isoprenoides. La actividad enzimática que tiene es de 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa.

INTRODUCCION

Fotosíntesis

Hace aproximadamente 3500 millones de años, se originaron las primeras bacterias anaeróbicas y fotosintéticas. Estos organismos adquirieron la capacidad de utilizar la energía luminosa solar para proveerse de electrones y protones del agua y ocuparlos en la generación de nutrientes a partir de CO₂. (Govindjee and Coleman, 1990).

Las bacterias fotosintéticas se pueden clasificar en tres grupos principales: las bacterias verdes sulfurosas, las bacterias rojas sulfurosas y las bacterias no sulfúreas. En general las bacterias no pueden fotosintetizar en presencia de oxígeno, algunas bacterias no sulfúreas pueden crecer en condiciones microaerofilicas, o incluso aeróbicas, pero en completa oscuridad.

Hace unos 1500 millones años se generaron los eucariotes unicelulares, entre los cuales se encuentran las euglenofitas y las clorofitas. Las clorofitas, algas verdes unicelulares o multicelulares son progenitores de las plantas terrestres (Margulis y Schwartz, 1981). Finalmente, en el devónico (entre 350 y 400 millones de años A.C), aparecieron sobre este planeta las primeras plantas vasculares. Aún en nuestra era, los organismos fotosintéticos (plantas, algas y diversos procariontes) regeneran el oxígeno molecular que se expelle en la respiración y se consume mediante la combustión, mientras proveen a la biósfera con la energía libre y el carbono requeridos para la gran variedad de ciclos vitales.

La reacción general que describe el proceso de la fotosíntesis se puede escribir:



donde H₂A es un reductor general y A es su producto oxidado. Generalmente la especie química A es oxígeno (fotosíntesis oxigénica; Matthews and Van Holde, 1991), aunque también puede ser azufre u otro aceptor de electrones.

La fotosíntesis oxigénica se realiza en dos etapas y en eucariontes, ocurre dentro de organelos llamados plástidos (principalmente en el cloroplasto). Durante la primera etapa, que se conoce como fase luminosa se utiliza la energía de la luz solar para oxidar la molécula H₂O (esto se realiza en el sistema endomembranal de los cloroplastos conocido como tilacoides; Figura 5). La fijación de carbono se realiza en la segunda etapa, o fase oscura en el espacio interno del organelo (estroma; Figura 5). En la fase luminosa el agente oxidante NADP⁺ se reduce a NADPH, produciendo equivalentes reductores con desprendimiento de O₂. Parte de esta energía es utilizada en la fotofosforilación para producir adenosina trifosfato (ATP), molécula que contiene enlaces de alta

energía. En la fase oscura, se utilizan el NADPH y el ATP para la síntesis reductiva de carbohidratos a partir de CO_2 y H_2O .

Las plantas asimilan el carbono utilizando alguna de tres vías fotosintéticas nombradas C_3 , C_4 y metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM) (Ehleringer *et al.*, 1991). El 85% de las especies vegetales poseen la vía fotosintética C_3 (Ehleringer *et al.*, 1991). Algunos ejemplos de plantas con este metabolismo son: la espinaca, el trigo, la papa, el pino y *Arabidopsis* (nuestro modelo de trabajo)

La enzima encargada de la fijación del CO_2 atmosférico es la ribulosa 1,5 difosfato carboxilasa-oxigenasa (Rubisco). Esta enzima normalmente cataliza la reacción entre el CO_2 atmosférico y la ribulosa 1-5 difosfato (RuBP), para producir dos moléculas de ácido fosfoglicérico (AFG), las cuales son metabolizadas hasta los productos finales de la fotosíntesis. La Rubisco también puede catalizar la oxigenación de RuBP para formar una molécula de ácido fosfoglicérico y una de fosfoglicolato, que al metabolizarse desprenderá CO_2 . Este proceso de oxigenación y descarboxilación se conoce como fotorespiración. La fotorespiración disminuye hasta en 50% la cantidad de CO_2 que puede ser fijado por la enzima (Ehleringer *et al.*, 1991).

En las plantas con metabolismo C_3 varían los niveles de fotorespiración dependiendo de la concentración de CO_2 y de O_2 . En las plantas C_4 la fotorespiración se da en mucho menor grado debido a una compartimentalización de las reacciones, donde el CO_2 se une al fosfoenol-piruvato para formar ácidos de cuatro carbonos (malato u oxaloacetato) que se transportan a las células del parénquima vascular, las cuales no están en contacto directo con el CO_2 y el O_2 atmosférico (Figura 1). Ahí, el ácido de cuatro carbonos libera el CO_2 , que es aprovechado por la Rubisco (Hatch, 1992). La concentración de CO_2 local es mucho mayor por la descarboxilación nocturna del malato en este compartimento. En las plantas con metabolismo CAM los estomas se cierran durante el día y la concentración interna de CO_2 aumenta por la descarboxilación del malato, favoreciendo la carboxilación sobre la oxigenación, por ello la fotorespiración en estas plantas es menor que en aquellas con metabolismo C_3 .

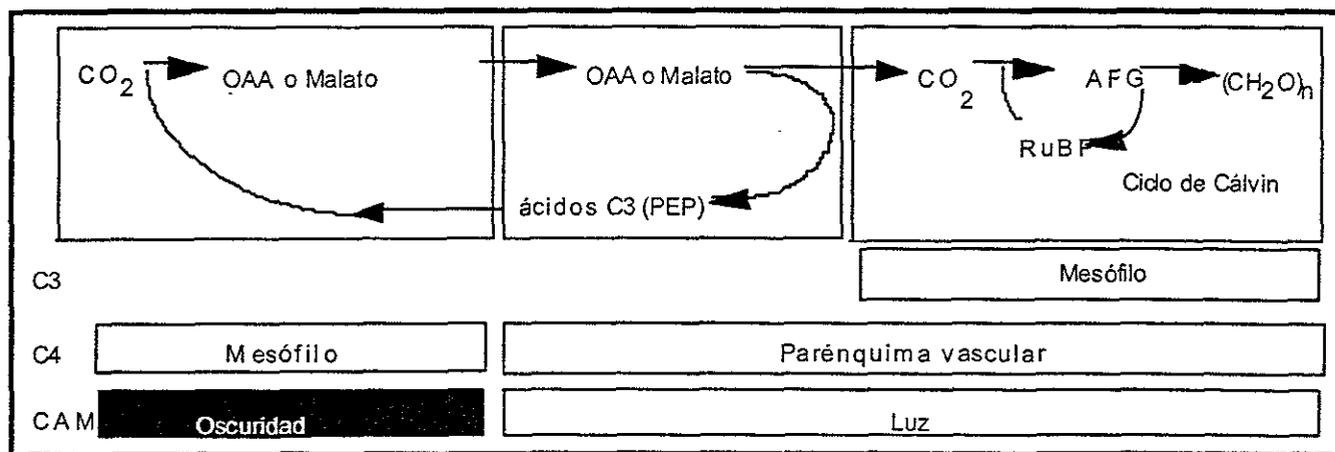


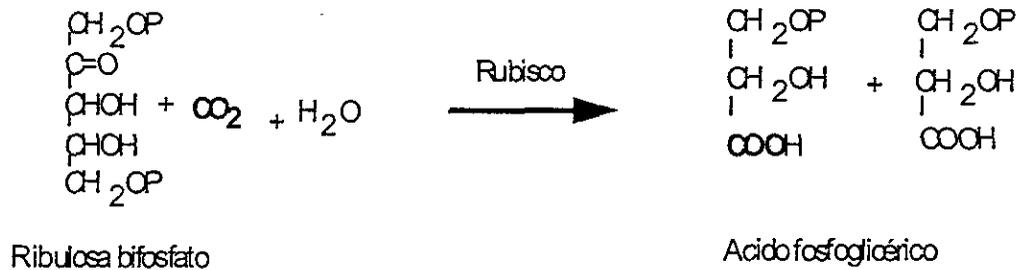
Figura 1 . Esquema general de las reacciones de carboxilación del metabolismo C_3 , C_4 y CAM. Las cajas muestran los compartimentos espaciales o temporales en los cuales se realizan las reacciones de plantas con diferente tipo de metabolismo.

El metabolismo C₄, que se considera como modificación del metabolismo C₃ es más eficiente a bajas concentraciones de CO₂; adicionalmente, es más eficiente la asimilación de agua en las plantas C₄ (Gallardo *et al.*, 1995) y presentan mayor tolerancia a la salinidad del suelo así como a la luz muy intensa (Hall and Rao, 1994). Este tipo de plantas requieren un ATP más por molécula de CO₂ fijada, el cual ocupan en la fosforilación del piruvato. El metabolismo C₄ se realiza en angiospermas tropicales o semitropicales, como la caña de azúcar, el maíz, el amaranto y el sorgo.

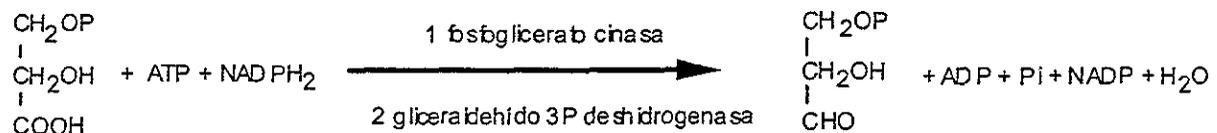
El metabolismo CAM se presenta en el 10% de la flora terrestre. Este metabolismo se realiza tanto en especies de zonas áridas del tipo de agaves, cactus y crasuláceas (Hall and Rao, 1994), como en orquídeas, bromelias y en las plantas suculentas como las liláceas.

Mecanismo de carboxilación y síntesis de glucosa.

El primer paso para la síntesis de glucosa es la fijación del carbono mediante la carboxilación, donde el CO₂ reacciona con un azúcar de cinco carbonos (la ribulosa 1,5-difosfato) para formar dos moléculas de ácido fosfoglicérico (AFG):



En seguida se reduce el AFG en un azúcar de tres carbonos con la ayuda energética del NADPH₂ y el ATP. Esta reacción se realiza en dos pasos. Primero, el ATP cede un fosfato para fosforilar al grupo carboxilo del AFG y se obtiene ácido 1,3-difosfoglicérico + ADP; después se reduce este ácido a fosfogliceraldehído por el NADPH, desprendiéndose ortofosfato (Pi). Las reacciones mencionadas tienen lugar en el estroma del cloroplasto.



La molécula aceptora de CO_2 , la RuBP se vuelve a formar mediante una serie de reacciones donde se producen azúcares-fosfato de tres, cuatro, cinco, seis y siete carbonos, y se recupera la capacidad de fijar CO_2 . Para formar una molécula de glucosa y regenerar la Ribulosa difosfato utilizada en este ciclo de reacciones, se necesitan fijar seis moléculas de CO_2 . El fosfogliceraldehído que es utilizado principalmente para la síntesis de azúcares, también puede ser sustrato para la formación de ácidos grasos, aminoácidos y ácidos orgánicos. El ciclo balanceado, esquematizado para la formación de glucosa se conoce como ciclo de Calvin y se ilustra en la figura 2.

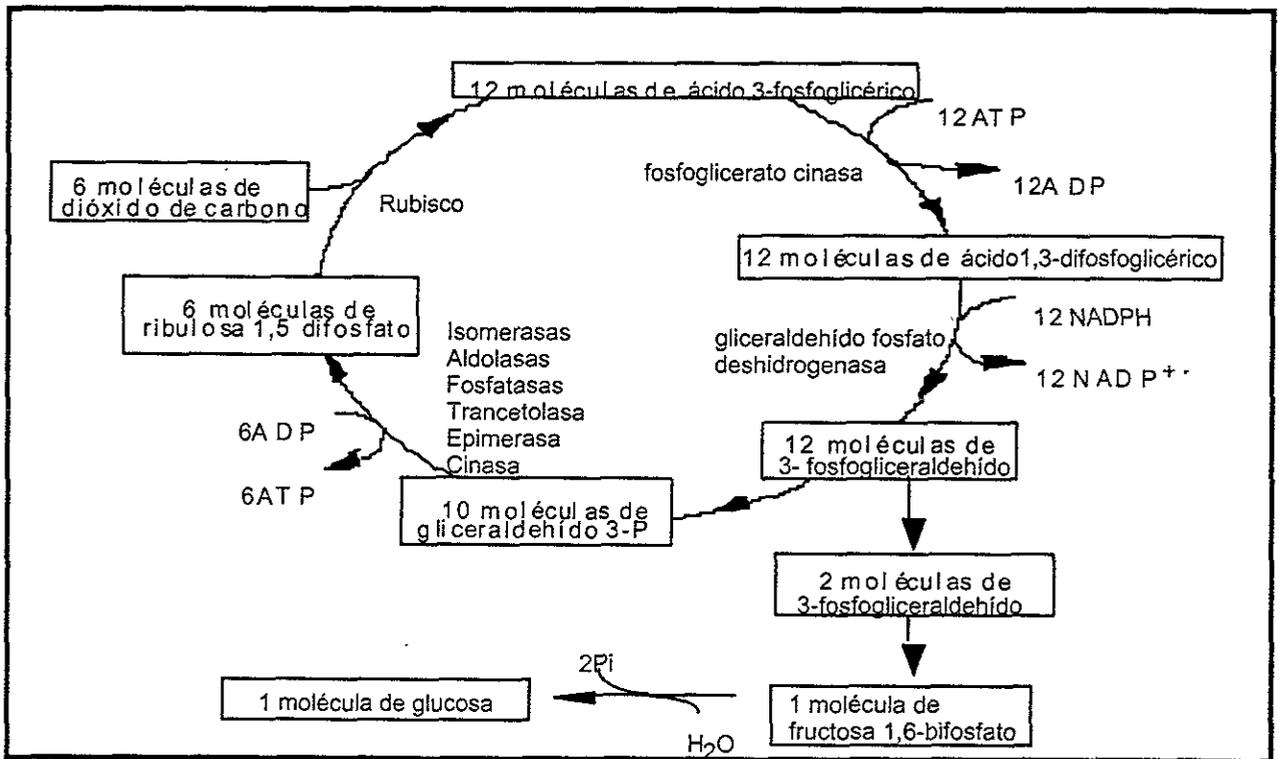


Figura 2. Esquema del ciclo de Calvin. Formación de glucosa mediante la fijación de CO_2 .

El almidón en el cloroplasto y la sacarosa de citosol se sintetizan a partir de el 3-fosfogliceraldehído generado en el ciclo de Calvin.

Fijación de CO_2 por la vía C_4 .

Muchos pastos tropicales inicialmente fijan el CO_2 formando compuestos de cuatro carbonos como oxaloacetato, malato y aspartato. Las actividades fotosintéticas en estas plantas están repartidas en dos tipos celulares morfológicamente distintos, acomodados en capas concéntricas, conocidas como mesófilo y parénquima vascular. Los

estomas de las plantas con metabolismo C₄ tienen su cavidad adyacente a las células del mesófilo, el CO₂ se difunde dentro de ellas y reaccionan con el ácido fosfoenol pirúvico (PEP) mediante la catálisis de la PEP carboxilasa.

El NADPH₂ reduce el oxalacetato a malato, en presencia de la malato deshidrogenasa. Este malato se descarboxila convirtiéndose en piruvato. El CO₂ desprendido se metaboliza mediante el ciclo de Calvin . La compartimentalización de las reacciones se ilustra en la figura 3.

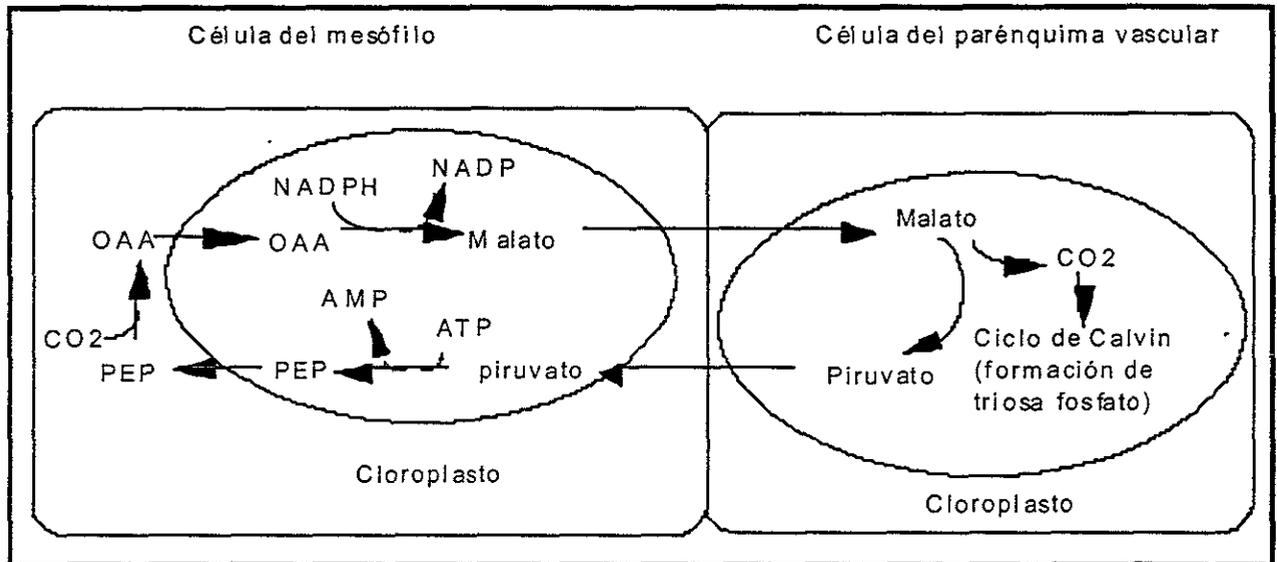


Figura 3. Esquema sobre la fijación de CO₂ via C₄ en maíz y caña de azúcar (Hatch, 1992). Aquí podemos observar el ciclo de asimilación de carbono en la fotosíntesis C₄. Este ciclo consiste básicamente en cuatro etapas (Taiz and Zeiger, 1991): 1) La asimilación de CO₂ mediante la carboxilación del fosfoenolpiruvato en las células del mesófilo para formar ácidos de cuatro carbonos (malato y/o aspartato); 2) Transporte de los ácidos C₄ a las células del parénquima vascular; 3) Descarboxilación de los ácidos C₄ en las células del parénquima vascular y generación de CO₂ que se reduce a carbohidratos por el Ciclo de Calvin o ciclo de reducción fotosintética de carbono; 4) Transporte de los ácidos C₃ formados por la descarboxilación (piruvato) a la célula del mesófilo y regeneración de la molécula aceptora de CO₂, el fosfoenol piruvato (PEP).

Metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM).

Las plantas con metabolismo CAM realizan el intercambio de gases con los estomas abiertos durante la noche (Ting, 1985). El CO₂ se combina con el PEP para formar ácido oxaloacético en presencia de la PEP carboxilasa citoplasmática de las células de la hoja. El ácido oxaloacético se transporta a vacuolas de almacenamiento, donde lo encontramos en forma de ácido málico. En presencia de luz, el ácido málico sale de la vacuola para descarboxilarse y producir moléculas de tres carbonos como piruvato o fosfoenolpiruvato. De este modo, se presenta una fluctuación diurna del pH debida al cambio de concentración de los ácidos orgánicos. Cuando hay luz, los estomas permanecen cerrados y el CO₂ que se libera en la descarboxilación, es fijado fotosintéticamente dentro de los cloroplastos.

Algunas plantas con CAM presentan una plasticidad peculiar que les permite fijar CO₂ durante el día a través de la rubisco, del mismo modo que las plantas con metabolismo C₃. Los factores ambientales como temperatura, humedad y fotoperíodo determinan el tipo de fotosíntesis que van a realizar estas plantas. Altas temperaturas, sequía y noches largas favorecen el metabolismo CAM.

Los plástidos.

Hemos hablado un poco sobre el metabolismo fotosintético, ahora continuaremos con los organelos donde se realiza este proceso en algas y en plantas. Los plástidos estudiados con mayor profundidad son los cloroplastos, organelos localizados principalmente en las hojas, dentro de las células del mesófilo, donde ocupan aproximadamente el 8% del volumen celular total. Su número es variable entre los diferentes tejidos, estados de desarrollo y especies (Anderson and Beardall, 1991). Estos organelos son los portadores del aparato fotosintético en plantas y algas. Los plástidos comparten las siguientes características: están rodeados por una envoltura estructurada por dos membranas, aproximadamente el 10% del DNA que necesitan para cumplir sus funciones está codificado en el propio genoma (plastoma), que se encuentra organizado como un genoma procarionte. Los demás genes necesarios para su estructuración y funcionamiento se encuentran en el genoma nuclear donde estos se transcriben, se traducen en el citosol y finalmente, las proteínas entran al organelo. Otra característica común a todos estos organelos es su capacidad de sintetizar ácidos grasos y aminoácidos. Algunos plástidos almacenan compuestos como almidón, proteínas o aceites. Los amiloplastos, por ejemplo, no contienen clorofila y tienen gránulos de almidón, se encuentran en diferentes tipos de células, como en tejidos de almacenamiento o la cofia de las raíces, así como en meristemos. Son esféricos y pueden tener al almidón en forma de un gránulo grande o varios pequeños. Los cromoplastos, organelos coloreados de amarillo naranja o rojo por su contenido de carotenoides, funcionan en gran medida como atractores de polinizadores y otros animales en flores y frutas (Newcomb, 1990), también se pueden encontrar algunos cromoplastos en raíces y hojas viejas (Possingham, 1980).

Origen evolutivo de los cloroplastos.

A nivel molecular, el proceso de la fotosíntesis es muy complejo, por lo cual no es fácil visualizar el modo en que fué evolucionando hasta ser como ahora. En algún momento durante la evolución de los seres vivos se dieron eventos de asociación simbiótica entre un organismo fotosintético y otro que no lo era. En el caso de las algas y plantas terrestres se piensa que los endosimbiontes que dieron origen al cloroplasto eran eubacterias fotosintéticas y en algunos casos quizá algas criptofitas que dieron origen a las algas cromofitas (Howe *et al.*, 1992; Gray, 1993).

Existen dos tipos de eubacterias que pueden tener relación filogenética con el proto-endosimbionte: las cianobacterias (que contienen clorofila a y ficobilinas) y las proclorofitas (que contienen clorofila a y b y no tienen ficobilinas) (Howe *et al.*, 1992).

Los eoplastos, amiloplastos, y los plástidos ameboides son precursores de los cloroplastos y se les conoce genéricamente como proplástidos. Los proplástidos se encuentran comúnmente en los meristemos, aunque pueden producirse durante la dormancia estacional, o repetidamente durante el desarrollo de la planta, como en el huevo en desarrollo, polen, cigoto y en semilla madura (Thomson and Whatley, 1980; Mullet, 1988).

Cuando se exponen a la luz crecen las membranas internas del cloroplasto para formar los tilacoides, que apilados se conocen como grana. Todas estas estructuras están embebidas en una matriz incolora nombrada estroma (figura 5). El espacio dentro del tilacoide se llama lumen y es aproximadamente de 5-10 nm de ancho.

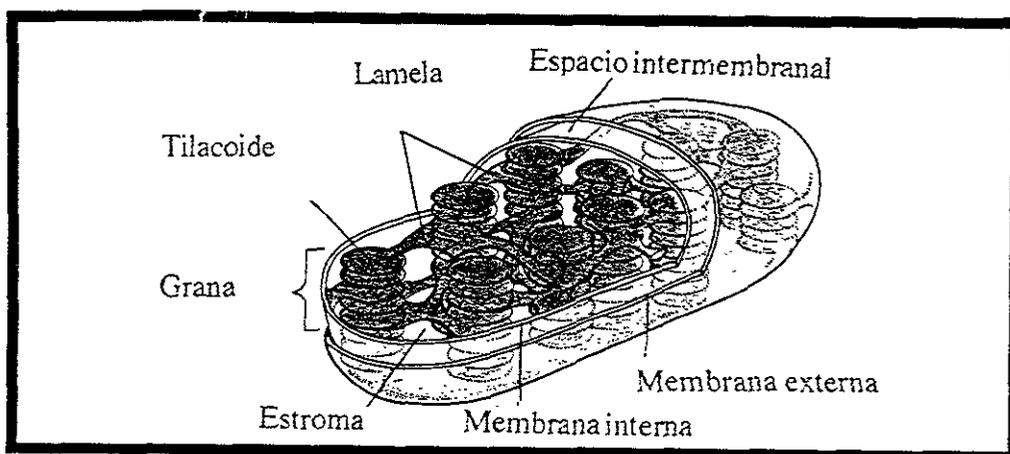


Figura 5. Esquema de un cloroplasto.

Factores ambientales que influyen en el desarrollo y funcionamiento del aparato fotosintético.

Al regar una semilla, el embrión seco entra en contacto con el agua y comienzan a dividirse las células del meristemo y a elongarse las del hipocotilo.

La luz es un factor primordial para el desarrollo y funcionamiento de los sistemas fotosintéticos vivos. Si un embrión se expone a la luz el hipocotilo deja de elongarse y se abre el gancho apical de los cotiledones. Si se cultiva una planta en condiciones de oscuridad continua, si es iluminada presenta una acumulación de clorofila seguida por el desarrollo de las estructuras de una planta adulta crecida en condiciones normales de iluminación (Armstrong et al., 1993; Barnes *et al.*, 1996). Ahora se conocen por lo menos 100 transcritos que cambian su concentración en respuesta a la luz. La acumulación o disminución de estos transcritos también puede estar influenciada por reguladores de crecimiento, productos metabólicos o el tipo celular (Piechulla, 1993).

Muchos otros factores del medio ambiente influyen en el desarrollo de las plantas y en el funcionamiento del aparato fotosintético (Gruissem and Tonkyn, 1993; Terzaghi and Cashmore, 1995): la salinidad, la sequía o la humedad, así como las concentraciones de O₂ y CO₂, la temperatura y la cantidad de nutrientes pueden hacer que la planta responda aumentando o disminuyendo la velocidad de su desarrollo y la calidad del proceso fotosintético (Portis, 1982).

En general todos los organismos eucariontes desarrollan actividades controladas por la alternancia cíclica del día y la noche, fenómeno al que se le ha llamado ritmo circadiano. El ritmo circadiano influye, por ejemplo en temperatura corporal, locomoción, índice mitótico, desprendimiento de O₂, intercambio de CO₂, movimiento de las hojas, bioluminiscencia, actividad fotosintética, apertura y cerrado de estomas, elongación del tallo, concentración de calcio en el cloroplasto (Johnson, *et al.*, 1995), niveles de proteína y cambios en la actividad enzimática (Adamska, *et al.*, 1991).

Muchos genes codificados en el núcleo presentan regulación circadiana a nivel transcripcional (Giuliano *et al.*, 1988; Adamska, *et al.*, 1991; Piechulla, 1993). Esto quiere decir que los niveles de transcrito comienzan a aumentar desde unas horas antes o inmediatamente después de la transición de oscuridad a luz, disminuyendo posteriormente en la tarde y en la noche. Algunos ejemplos de genes regulados por luz son: la Rubisco, la proteína que une clorofila a/b (CAB), la chalcona sintasa (CHS), la proteína de inducción temprana por luz (ELIP), fitocromo A (PHYA), Ferredoxina (FEDA), y la nitrito reductasa. El transcrito de CLA1 se regula también por luz (Mandel *et al.*, 1996).

Transporte de proteínas al cloroplasto.

Aproximadamente el 10% de las proteínas del cloroplasto están codificadas en el DNA propio del organelo y el resto están codificadas en el genoma nuclear. Estas proteínas se traducen en el citoplasma y finalmente se importan post-traduccionalmente al cloroplasto.

En general las proteínas de cloroplasto codificadas en núcleo que se conocen contienen en el extremo amino terminal una extensión de 30 a 100 aminoácidos conocida como péptido de tránsito. Dicho péptido se separa del precursor proteico en el cloroplasto, liberando a la proteína madura. Además, el péptido de tránsito puede tener dos dominios si la proteína tiene que atravesar la membrana del cloroplasto y la membrana tilacoidea (Smeekens, *et al.* 1986). Recientemente se descubrió una manera peculiar de transporte del precursor de la subunidad pequeña de la Rubisco en *Euglena gracillis*. En este caso la proteína se integra a la membrana del retículo endoplásmico, se va al aparato de Golgi inmersa en la membrana para después viajar a su destino final, el cloroplasto (Sullí and Shwartzbach, 1996).

¿Cuál es el mecanismo de entrada de las proteínas al cloroplasto?. Hay evidencias que sugieren que los péptidos de tránsito interaccionan con lípidos de la membrana externa del cloroplasto (Van't Hof *et al.* 1991; Theg and Geske, 1992; Horniak *et al.*, 1993). Por otro lado, al utilizar anticuerpos antiidiotípicos, se han aislado proteínas que son receptores tentativos de los péptidos de tránsito (Cornwell and Keegstra, 1987; Pain *et al.*, 1988; Schnell, *et al.*, 1990). Analizando estos datos, se ha pensado que en el mecanismo de entrada de la proteína al cloroplasto hay una primera interacción del precursor con los lípidos de la membrana y después con un receptor protéico (Theg and Scott, 1993).

Los péptidos de tránsito a cloroplasto descritos en la literatura, tienen entre sí una similitud baja a nivel de secuencia primaria (Keegstra and Olsen, 1989). Como no hay consenso en la estructura primaria de estos péptidos, se ha postulado que tienen similitud en su estructura secundaria y terciaria (Archer and Keegstra, 1993). Además, los péptidos de tránsito a cloroplasto comparten una serie de propiedades entre las que se encuentran el tener muchos aminoácidos hidroxilados y aromáticos, y muy pocos residuos ácidos (uno o dos normalmente; Theg and Scott, 1993). La Proteína CLA1 contiene un péptido de tránsito putativo con estas características (Pedrero-Hernández, 1994).

Locus similar a CLA1 en *Rhodobacter capsulatus*:

La secuencia homóloga a CLA1 en la bacteria fotosintética *Rhodobacter capsulatus* se encuentra en un extremo del operón fotosintético *puf* (figura 7).

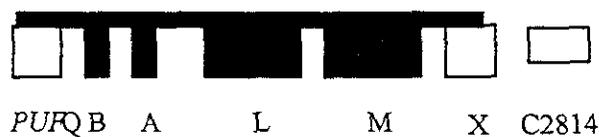


Figura 7. Operón fotosintético *puf* de *Rhodobacter capsulatus* (Bauer et al, 1993).

A su vez, el operón *puf* se encuentra en una región conocida como grupo de genes fotosintéticos (Youvan, et al., 1984). La transcripción de los operones *puf*, *puh* y los operones para la biosíntesis de pigmentos que se encuentran corriente arriba (Bauer et al., 1993) está relacionada con la actividad fotosintética. El operón *puf* se regula por la concentración de oxígeno, por luz y codifica para las subunidades a y b del complejo de captación de luz I y los polipéptidos L y M del centro de reacción (Sganga and Bauer, 1992); también codifica para *PUFQ*, proteína que controla los niveles de bacterioclorofila en la célula (Bauer et al, 1993). La proteína codificada al extremo, por *puf X*, es importante para la estructura funcional del aparato fotosintético; cuando no está presente disminuye la eficiencia en transferencia electrónica del centro de reacción al citocromo b/c1 (Lilburn et al., 1992).

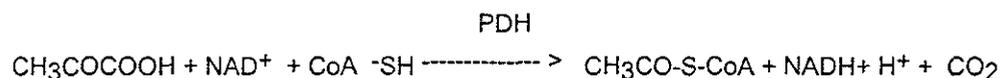
Enzimas que unen tiamina difosfato (TPP).

Cosiderando la similitud de la secuencia protéica de CLA1 con enzimas dependientes de TPP (ver resultados), a continuación se describe brevemente este grupo de proteínas. En la naturaleza existen varias enzimas que utilizan como cofactor TPP para la catálisis de ciertas reacciones bioquímicas que involucran el rompimiento de enlaces C-C adyacente a un grupo ceto. Entre ellas se encuentran las α -cetoácido descarboxilasas y las cetolasas; como la piruvato descarboxilasa (Dyada et al., 1993), la transcetolasa (Nikkola et al, 1994) y el componente 2-oxo-ácido del complejo 2-oxo-ácido deshidrogenasa (Packman et al., 1984).

Las proteínas dependientes de TPP comparten a nivel de estructura primaria la siguiente secuencia: GDG/AXNC/N (Robinson and Chun, 1993); además, para su funcionamiento, requieren Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} ó Co^{2+} (Nikkola *et al*, 1994).

La piruvato descarboxilasa es más específica por sus sustratos que la transcetolasa, la cual es capaz de utilizar una mayor variedad. Sin embargo, parece que ambas derivaron de un mismo gen ancestral (Robinson and Chun, 1993).

El complejo multienzimático de las 2-oxoácido deshidrogenasas catalizan la descarboxilación oxidativa de piruvato, 2 oxo-glutarato y 2 oxo-ácidos ramificados, generando el acil-CoA y NADH correspondientes (Lessard and Perham, 1994). Estos complejos multienzimáticos son muy importantes tanto en el metabolismo de la glucosa, como en la producción de energía. Los complejos multienzimáticos mencionados, están formados por la combinación de tres componentes enzimáticos: el llamado E1 que es una 2 oxo-ácido descarboxilasa (Dyada *et al*, 1993); E2 es una dihidrolipoil acetil transferasa ; E3 es una dihidrolipoil deshidrogenasa. El componente E1 de la piruvato deshidrogenasa (PDH) es un homotetrámero de esta clase, que cataliza la descarboxilación de piruvato a acetaldehído. El producto obtenido se procesa mediante el ciclo del ácido cítrico. En seguida se esquematiza la reacción (Lehninger, 1981):



Las piruvato descarboxilasas de eucariotes tienen 60 subunidades en un cuerpo de E2 arregladas en una forma de icosaedro a la cual se encuentran unidas 20-30 copias de la enzima E1, tetramérica $\alpha_2\beta_2$ y seis copias de homodímero E3.

La transcetolasa es una enzima que funciona como homodímero para transferir un segmento de dos carbonos de un cetol a un aldehído (Linqvist *et al*, 1993). La enzima no es muy específica y el cetol puede ser xilulosa-5-fosfato, fructosa 6-fosfato, o sedoheptulosa-7-fosfato y como aldehído aceptor pueden estar la ribulosa 5-fosfato, el gliceraldehído 3-fosfato o la eritrosa 4-fosfato.

La transcetolasa está conformada por dos subunidades iguales con tres dominios cada una. En el dominio amino, hay una lámina β paralela, rodeada por hélices de ambos lados. También hay hélices en la parte superior del dominio. El sitio activo está localizado en el extremo carboxilo de las láminas β (Nikkola *et al*, 1994). El dominio medio también es una cadena β de seis cadenas paralelas rodeadas por hélices. La parte que interacciona con el TPP es la de las láminas β (Linqvist *et al*, 1993). Este dominio tiene el mismo plegamiento que el dominio amino. El dominio carboxilo es el menos conservado, tiene una parte central de láminas β mezcladas, rodeadas por hélices a ambos lados (Linqvist *et al*, 1993). La interacción entre los dominios es mediante las hélices y estructuras de tallo. Los monómeros interaccionan entre sí para formar el dímero entre los dominios amino y medio (Lindqvist *et al*, 1992).

CLA1, la proteína objeto de este trabajo es similar a las transcetolasas en toda su extensión, pero se parece aún más a una nueva clase de transcetolasas recientemente descritas en la literatura que catalizan la formación de 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato (Sprenger *et al*, 1997; Lois *et al*, 1998). Este sustrato es precursor en una vía alterna para la síntesis de isoprenoides, tiamina y piridoxol. La ruta clásica de formación de isopentenil difosfato, precursor de los isoprenoides, es una serie de reacciones donde el acetil y el acetoacetil-CoA reaccionan para producir mevalonato que se fosforila y se

descarboxila para convertirse en isopentenil difosfato. La ruta recientemente descrita parte de piruvato y gliceraldehído 3-fosfato para formar 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato con la catálisis del TPP. Este producto se transforma a su vez en isopentenil difosfato (Figura 6).

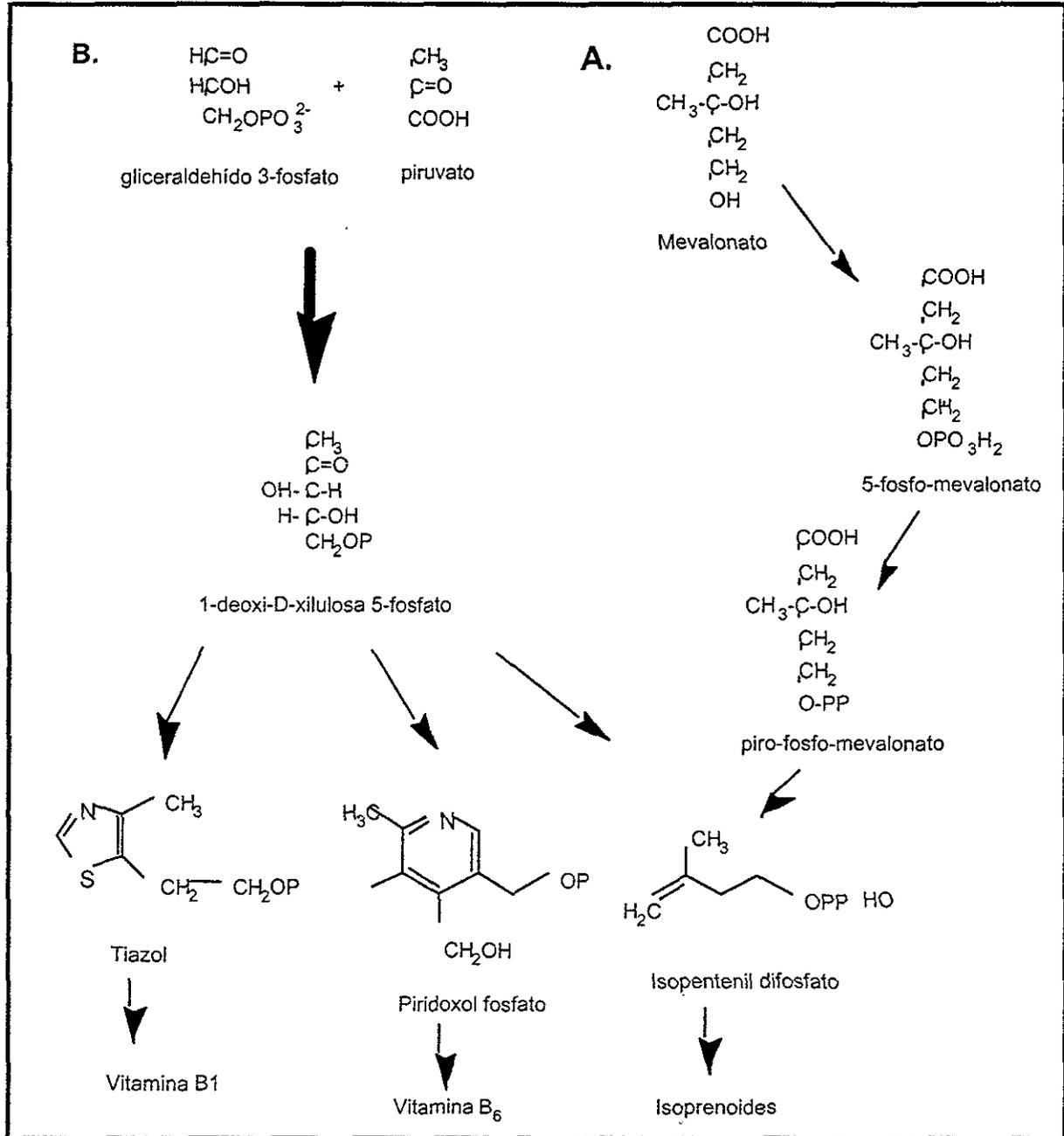


Figura 6. Vías para la producción de Isoprenoides. A. La vía clásica parte de Mevalonato, B. La vía recientemente descrita de 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato.

ANTECEDENTES A ESTE TRABAJO.

En este trabajo se utilizó una mutante albina de *Arabidopsis thaliana* incapaz de fotosintetizar, nombrada *cla1-1* debido a sus cloroplastos alterados. Detallando el fenotipo de *cla1-1*, se observa a través de microscopía electrónica que en la mutante no encontramos cloroplastos. Los plástidos que se presentan en la figura 8 no tienen tilacoides, y los niveles de carotenos y clorofilas están reducidos (Mandel *et al.*, 1996). Si la mutante *cla1-1* se cultiva en oscuridad continua se etiola. Al exponerla a la luz se abren los cotiledones y el hipocotilo toma el tamaño habitual de una planta silvestre expuesta a luz. La mutante *cla1-1* (Mandel *et al.*, 1996) fué aislada a partir de un banco de mutantes obtenidas mediante la inserción de un T-DNA por Kennet Feldman (Feldman, 1991). Al estudiar la segregación del fenotipo albino mencionado (uno:tres) se concluyó que la mutación era recesiva y monogénica. A su vez, se comprobó que un solo gen era el responsable del fenotipo por experimentos de complementación (Mandel *et al.*, 1996).

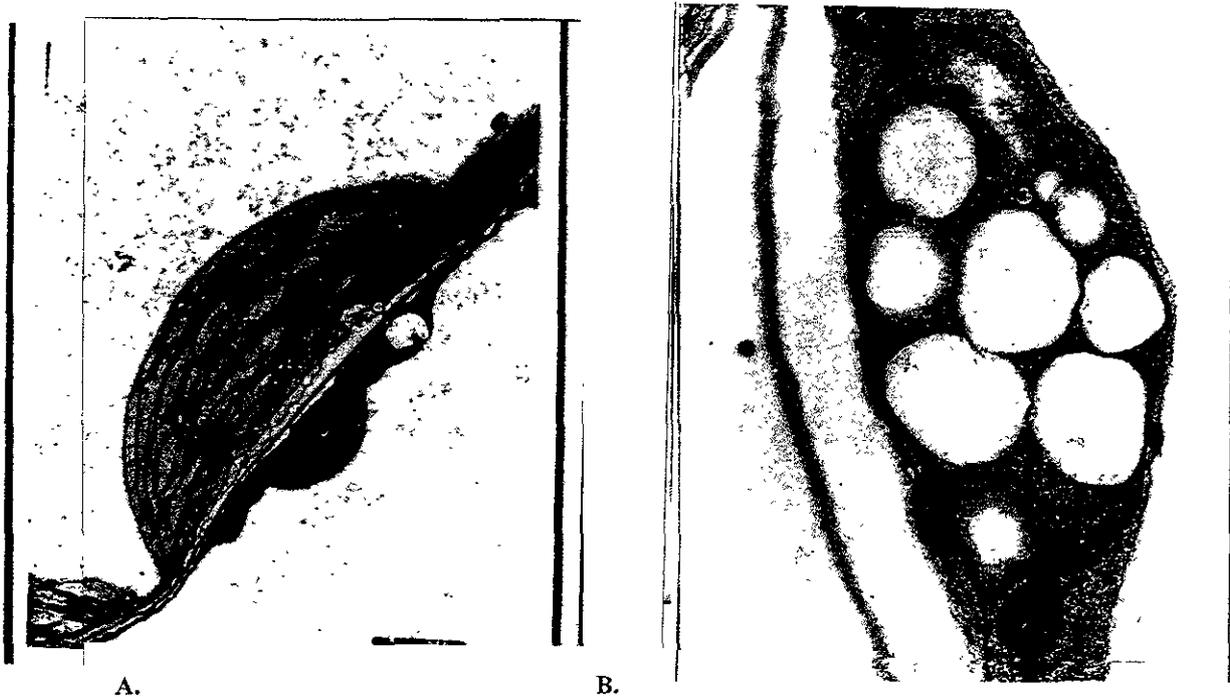


Figura 8. A. Cloroplasto silvestre. Se puede observar en esta fotografía al microscopio electrónico una apilación membranal que forma los tilacoides. B. Cloroplasto de la mutante *cla1-1*. En esta figura se ve como no hay un desarrollo membranal típico.

Para comenzar con la caracterización del gen *CLA1* se tamizó un banco de DNA genómico de la planta mutante y se aisló un fragmento de *CLA1* situado junto al borde izquierdo del T-DNA insertado. Se clonó dicho fragmento en el vector Bluescript KS(+) (Mandel *et al.*, 1996). Se utilizó un fragmento de la clona de DNA genómico para tamizar un banco de cDNA de *Arabidopsis thaliana*, de donde se obtuvieron varias clonas. Estas clonas se utilizaron para obtener la secuencia del cDNA de *CLA1* (Pedrero, 1994). Después de clonar y secuenciar el gen *CLA1*, se realizó una búsqueda en el GenBank de secuencias similares a su producto de traducción (que llamamos CLA1). Con este fin se utilizó el programa FASTA (paquete Winsconsin del "Genetics Computer Group" (GCG)

(Altschul *et al.*, 1990). Con este programa se encontró que *CLA1* tiene similitud con un marco de lectura abierto de *Rhodobacter capsulatus* (C2814) (Pedrero, 1994) el cual se encuentra justo bajo el operón fotosintético *puf* (Youvan *et al.*, 1984).

Mediante experimentos tipo Northern se encontró que el RNA mensajero de *CLA1*, se expresa más en tejido de plantas maduras que en plantas juveniles (Pedrero, 1994). Esto habla de la posibilidad de un requerimiento diferencial del producto de traducción del gen *CLA1*. El desarrollo deficiente de los plástidos en la mutante, también nos hace pensar en que el gen *CLA1* es necesario en cierto momento del desarrollo de dichos organelos.

Con la realización de experimentos tipo Northern se encontró que hay una acumulación del mensajero de *CLA1* como respuesta a la luz en *Arabidopsis*, (Mandel *et al.*, 1996). Gran parte de los genes fotosintéticos, como por ejemplo el gen que une clorofila *a/b* (*CAB*) aumentan su expresión al ser iluminados.

Se realizaron experimentos tipo Northern en los que se encontró expresión de *CLA 1* en col, maíz y frijol, así como en tejido verde y raíz (señal baja) de *Arabidopsis thaliana* (Pedrero, 1994). Estos resultados sugieren que debe haber una proteína homóloga a *CLA1* en otras plantas.

La secuencia de *CLA1* tiene en el extremo amino terminal una región con características de un péptido de internalización a cloroplasto (Pedrero, 1994). Este segmento no aparece en la secuencia similar a *CLA* en *Rhodobacter*, lo que sugiere que *CLA1* está codificada en el núcleo y se desplaza hacia dentro del cloroplasto. Siendo así, esta proteína debe ser abundante en tejido verde y más aún, en los cloroplastos.

En el presente trabajo se encontró que *CLA1* se parece a las transcetolasas en toda su extensión, lo mismo que al componente E1 del complejo multienzimático piruvato deshidrogenasa. Dichas enzimas catalizan la transferencia de radicales con dos carbonos de una molécula a otra. Se encontró mayor similitud aún con una nueva clase de transcetolasas que catalizan la formación de deoxi-D xilulosa 5-fosfato (Sprenger *et al.*, 1997; Lois *et al.*, 1998).

HIPOTESIS

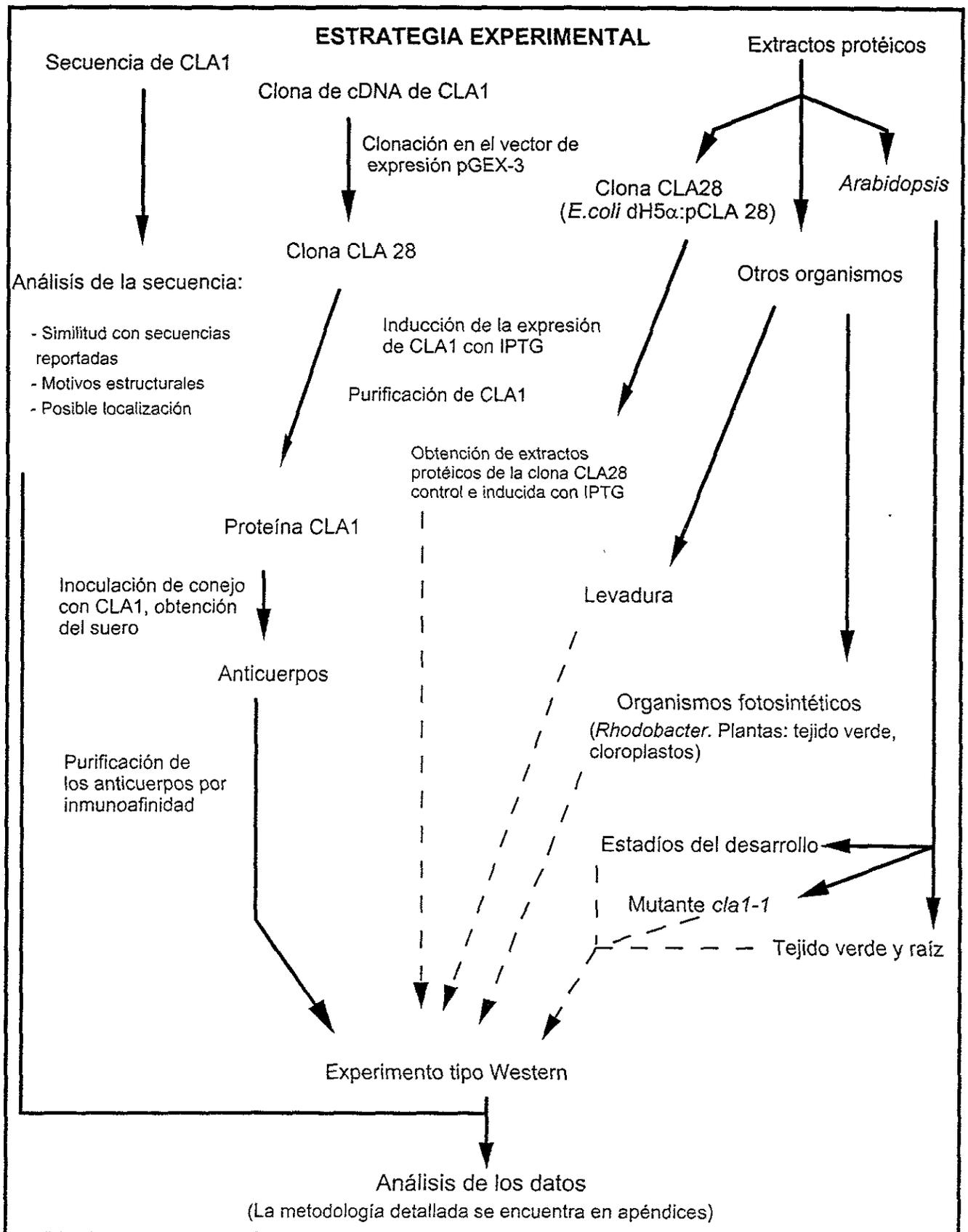
Las hipótesis sobre la localización y el comportamiento de *CLA1* son las siguientes: el gen nuclear *CLA1* codifica para una proteína que se transporta a cloroplasto donde cumple su función. La expresión de *CLA1* podría cambiar en función del desarrollo de la planta ya que la proteína *CLA1* se requiere para que la planta tenga cloroplastos maduros. *CLA1* debe estar presente en otros organismos fotosintéticos.

OBJETIVOS.

El objetivo general es la caracterización del gen afectado por la inserción del T-DNA en la mutante *cla1*.

Los objetivos particulares de este proyecto son:

- 1) Realización de un experimento para comparar la abundancia relativa de *CLA1* en el cloroplasto y la hoja.
- 2) Determinación del perfil de expresión de *CLA1* en función del desarrollo de la planta .
- 3) Búsqueda de la expresión de *CLA1* en otra planta con metabolismo C3, en una planta con metabolismo C4, en gimnospermas, en *Rhodobacter*. y en levadura.
- 4) Predicción de la posible función de la proteína *CLA1* de *Arabidopsis thaliana* mediante el análisis de la secuencia.



RESULTADOS

Análisis de la secuencia.

Para la búsqueda de secuencias reportadas en los bancos de secuencias GenBank, EMBL, y SWISS-PROT similares a la secuencia de CLA1 se utilizaron los programas TFASTA, BLAST y TBLASTN (paquete Wisconsin versión 9 del "Genetics Computer Group" (GCG) (Altschul *et al.*, 1990)). De este modo se encontró una similitud significativa de CLA1 con las secuencias polipeptídicas que se muestran en la tabla 1.

# de acceso	Organismo	Idn(%)	Lng (aa)
D46713	<i>Oryza sativa</i>	76.98	127
H75224	<i>Pinus taeda</i>	77.38	149
AFO19386	<i>Mentha x piperita</i>	77	650
T14878	<i>Ricinus communis</i>	76.47	100
S111995	<i>Synechocystis sp</i>	55.5	671
P26242	<i>Rhodobacter capsulatus</i>	54.5	665
B07846	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	49.2	100
P45205	<i>Haemophilus influenzae</i>	48.3	665
U82664	<i>Escherichia coli</i>	48.14	665
P5452	<i>Bacillus subtilis</i>	44.58	665
AA294337	<i>Onchocerca volvulus</i>	41.73	149
U15181	<i>Mycobacterium leprae</i>	36.56	741
Z96072	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	38.52	665
2182531	<i>Rhizobium sp.</i>	27.89	366
P50137	Transcetolasa de ratón	22.35	572
P11177	E1 β PDH Humano	22.42	365

Tabla 1. En esta tabla se muestra la similitud de los productos de la traducción teórica de genes o fragmentos de ellos homólogos a CLA1, encontrados en los bancos de genes. En la primera columna tenemos las claves de acceso para las secuencias similares en el banco de genes; en la segunda columna se nombran los organismos que contienen dichas secuencias; la tercera columna muestra el % de identidad de la secuencia de CLA1 con las secuencias de la primera columna; finalmente, la cuarta columna nos dice la longitud del alineamiento de CLA1 con cada una de las secuencias correspondientes. Lng=Longitud. Idn= Identidad.

Casi todas las secuencias similares a CLA1 que se muestran en la tabla, son secuencias polipeptídicas obtenidas mediante la traducción teórica de marcos de lectura abiertos reportados en los bancos de genes. Las secuencias correspondientes a proteínas con función conocida que se encontraron fueron varias transcetolasas (en la tabla 1 se enlista la

de ratón), y el componente E1 del complejo multienzimático piruvato deshidrogenasa (E1 β PDH humana) . Como se ve en la tabla 1, hay secuencias con alta similitud a CLA1 en otras plantas, y un parecido significativo con secuencias de bacterias fotosintéticas y no fotosintéticas.

En la región amino de CLA1, hay un segmento de 62 aminoácidos que no se encuentra en las proteínas similares de los otros organismos que se muestran en la tabla 1. Las secuencias de plantas reportadas que se muestran en la tabla son pequeñas y se encuentran hacia abajo de esta región. En *Mycobacterium leprae* existe un segmento ligeramente más grande que la región amino de CLA1 pero que no es significativamente similar a ésta. La región amino de CLA1, tiene todas las características de un péptido para transporte al cloroplasto.

Por último en cuanto a este análisis teórico, se buscaron secuencias con una función conocida utilizando para ello el programa MOTIFS, del paquete Wisconsin versión 9 del "GCG". De este modo se encontró que en *Synechocystis sp.* al igual que en *Rhodobacter capsulatus* existe una secuencia identificada como firma de transcetolasa, y un sitio de unión a tiamínpirofosfato (TPP). En CLA1 y sus homólogos estos sitios no son idénticos, pero las regiones importantes de interacción con el TPP se encuentran bastante conservadas y por tanto será esencial en la función de las proteínas alineadas. En la figura 9 se muestra un alineamiento de la secuencia polipeptídica deducida de CLA1 con algunas de las secuencias más parecidas encontradas en los bancos de secuencias que se listan en la tabla 1. Este alineamiento se realizó en el programa GenWorks (Glynias, 1990) utilizando los parámetros estándar que tiene el programa. Del lado izquierdo del alineamiento se marca cuales organismos contienen la secuencia similar a CLA1 que le sigue. Las cajas muestran los aminoácidos conservados entre todas las secuencias alineadas. La línea negra señala la zona de interacción teórica con TPP (Linqvist, 1992) de la secuencias alineadas. La línea rayada, muestra la secuencia correspondiente a la firma teórica de una transcetolasa.

Obtención de la proteína CLA1.

Para sobreproducir la proteína CLA1 se clonó el gen *CLA1* en el vector de expresión pGEX-3 como se describe en la sección de métodos. Se aisló DNA plasmídico de varias clonas con señal positiva en el experimento de hibridación en colonia y se secuenció uno de los plásmidos que contenía el inserto de 2030 pb correspondiente a *CLA1*. A este plásmido lo llamamos pCLA28 (pCLA28=pGEX-3::*CLA1*) y a la clona en *E.coli* DH5 α que contenía al pCLA28 la llamamos clona CLA-28. CLA28=dH5 α (pCLA28).

En condiciones de inducción con IPTG se notó la aparición de una banda intensa de 67KDa en la clona CLA28; a esa altura no se nota una banda en ninguno de los controles como se muestra en la figura 10. A.

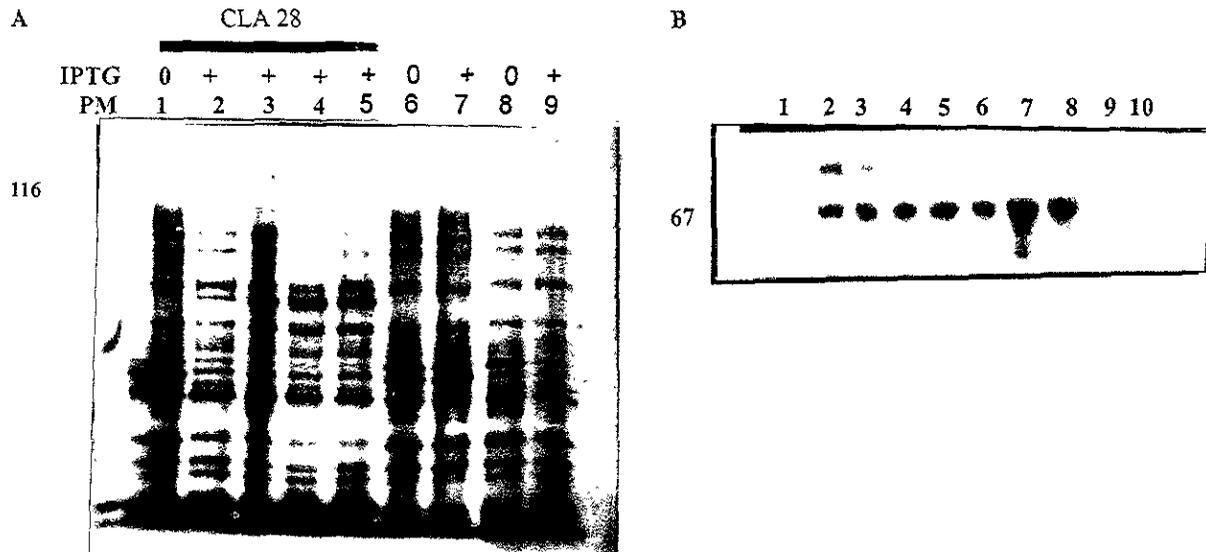


Figura 10. A. Gel con extractos protéicos de cultivos bacterianos sin inducir e inducidos con IPTG 2mM. Marcadores de peso molecular. Carril 1. Clona CLA28 sin inducir. Carril 2. Clona CLA28 incubada 20 minutos con IPTG. Carril 3. Clona CLA28 incubada 2 horas con IPTG. Carril 4. Clona CLA28 incubada por 3 horas con IPTG. Carril 5. Clona CLA28 incubada 4 horas con IPTG. Carril 6. Cultivo de *E.coli* dH5 α sin inducir. Carril 7. Cultivo de *E.coli* dH5 α incubado por dos horas con IPTG. Carril 8. Cultivo de *E.coli* dH5 α con el plásmido pGEX-3 sin inducir. Carril 9. Cultivo de *E.coli* dH5 α con el plásmido pGEX-3 incubado con IPTG por 2 horas. B. Cinética de inducción de la clona CLA28 incubada con IPTG por diferentes tiempos. Carril 1. 15 minutos. Carril 2. 30 minutos. Carril 3. 45 minutos. Carril 4. 1 hora. Carril 5. 1 1/2 hora. Carril 6. 2 horas. Carril 7. 2 horas 1/2. Carril 8. 3 horas. Carril 9. 4 horas. Carril 10. t=0.

Como se tenía una buena inducción en la producción de CLA1, se decidió utilizar la clona CLA28 para sobreproducir y purificar la proteína. Se analizaron los extractos protéicos en la fracción soluble e insoluble después de sonicar y centrifugar la clona 28. CLA1 se encontró en la fracción insoluble, en la soluble no se apreciaba.

En un gel desnaturalizante de poliacrilamida, se separaron proteínas totales de la clona CLA28, a diferentes tiempos de incubación con IPTG, para encontrar cuando se producía mayor cantidad de nuestra proteína de interés. Como se ve en la figura 10. B, esto sucedió a las dos horas y media de inducción.

Para la purificación de CLA1 se tomó la mezcla de proteínas aisladas de la fracción insoluble de la cepa sobreproductora, se resuspendieron en un buffer básico (pH 10), se le agregó sulfato de amonio hasta el 15% de saturación. Las proteínas se dializaron y se separaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10% y se electroeluyó la banda correspondiente a CLA1 que se indica en la figura 11.

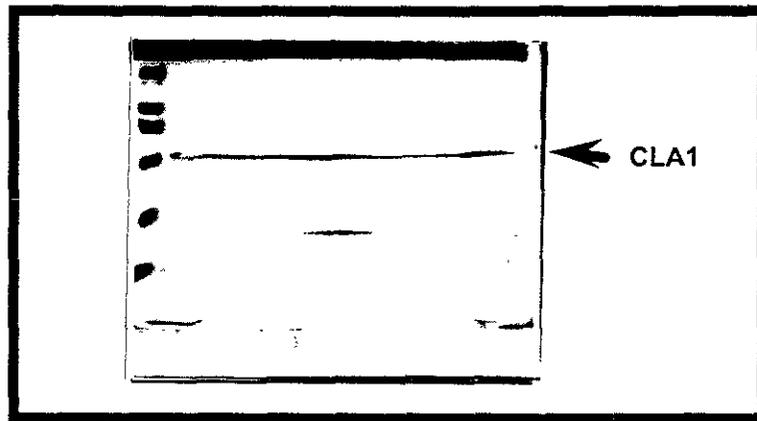
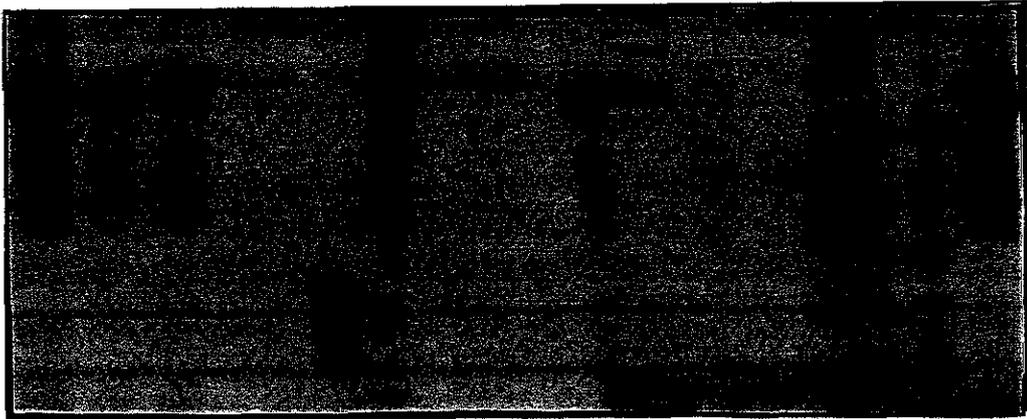


Figura 11. A. Gel donde se separó por electroforesis la mezcla de proteínas obtenidas por precipitación con sulfato de amonio al 15%, la banda purificada se electroeluyó como se describe en la sección de métodos.

Inmunodetección de CLA1.

Como se describe en la sección de métodos y en el apéndice de protocolos, se obtuvieron anticuerpos contra la proteína CLA1 en conejo. Dichos anticuerpos se purificaron y con ellos se realizó el experimento tipo Western que se muestra en la figura 12.

	HA 5	HA12	HA 30	RA 12	SA	HCLA	HP	HE	CE	-	+	RS	SC	HM
A.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	3	14
--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	---	----

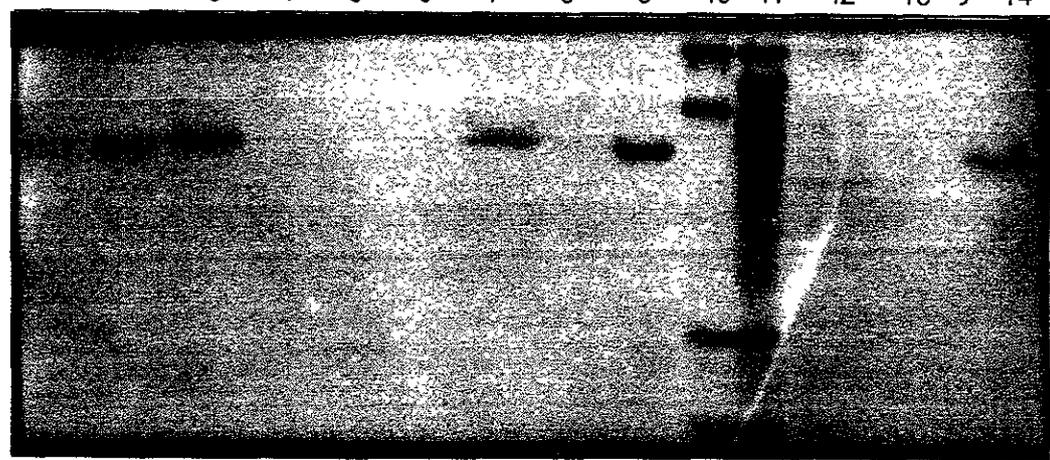


Figura 12.A. Gel teñido por Coomassie con las muestras que se enumeran adelante para cada carril. **B.** Experimento tipo Western utilizando extractos protéicos iguales a los del gel A. En cada carril de este experimento se colocaron extractos protéicos totales de los tejidos, estados de desarrollo y organismos que se enumeran (50 µg cuantificados por el método de Bradford, 1976).

Carril 1 (HA 5). Hojas de *Arabidopsis thaliana* con 5 días de edad (plántulas). **Carril 2** (HA12). Hojas de *Arabidopsis thaliana* con 12 días de edad (plantas juveniles). **Carril 3** (HA30). Hojas de *Arabidopsis thaliana* con 30 días de edad (plantas adultas). **Carril 4** (RA12). Raíz de *Arabidopsis thaliana* con 12 días de edad. **Carril 5** (SA) Semillas de *Arabidopsis*. **Carril 6** (HCLA). Hojas de la mutante *cla1-1* con 12 días de edad. **Carril 7** (HP). Hojas de Pino. **Carril 8** (HE). Hojas de espinaca. **Carril 9** (CE). Cloroplastos aislados de hojas de espinaca. **Carril 10** (-). Clona CLA-28 cultivada en condiciones normales. **Carril 11** (+). Clona CLA-28 cultivada en condiciones de inducción con IPTG. **Carril 12** (RS). *Rhodobacter sphaeroides*. **Carril 13** (SC) *Saccharomyces cerevisiae*. **Carril 14** (HM). Hojas de maíz.

Se ensayaron muestras de proteínas totales de *Arabidopsis* en cuatro etapas de su desarrollo: plántulas, plantas juveniles, plantas adultas y semillas, notándose que en semillas no se detecta señal. En las demás si hay una banda de 57 KDa que aumenta de intensidad en función de la edad. En el carril 4, correspondiente a raíz no se detectó señal alguna.

Para el experimento tipo Western se eligió al maíz por ser una gramínea, monocotiledónea con metabolismo C₄ donde ya se había encontrado RNA mensajero de *CLA1* (Pedrero, 1994); pino, por ser una gimnosperma de la cual se había reportado una clona (H75224) cuya traducción teórica tiene alta similitud a un fragmento de *CLA1*. La espinaca ofrece facilidades metodológicas para la purificación de sus cloroplastos, así que se utilizó la hoja de esta planta para comparar la concentración de la proteína *CLA1* en la hoja con respecto al cloroplasto.

Se presentó una banda de 57 KDa también en los carriles 7, 8, 9 y 14 correspondientes a los extractos de pino, espinaca, cloroplastos de espinaca y maíz respectivamente, siendo mucho más intensa la banda del carril con proteínas de cloroplasto que el que tiene las de hojas de espinaca.

DISCUSION

El crecimiento y la diferenciación de las células, los órganos y los organismos, está dispuesto de una manera muy compleja . La generación de mutaciones permite alterar la secuencia de eventos que suceden en el funcionamiento normal de un ser viviente. El cambio generado tendrá un efecto de mayor o menor grado dependiendo de la función que se haya afectado.

En este proyecto se trabajó con el gen *CLA1* de *Arabidopsis thaliana* cuya mutación provoca una alteración en el desarrollo de los cloroplastos (Mandel *et al.*, 1996).

Localización de CLA1.

Observando el alineamiento de secuencias (Figura 9) notamos que la secuencia de CLA1 tiene en el extremo amino un segmento que no se encuentra en las otras secuencias. Esta región posee todas las características de un péptido para transporte al cloroplasto (Pedrero, 1994). En la tabla dos tenemos los resultados obtenidos mediante el programa PSORT (Nakai,1991; Nakai, 1992), los cuales indican que la ubicación mas probable de CLA1 es en el estroma del cloroplasto:

Lugar	Certidumbre (0-1)
Estroma del cloroplasto	0.872
Membrana del tilacoide	0.540
Lumen del tilacoide	0.488
Matriz mitocondrial	0.431

Tabla 2. Predicción teórica sobre la localización subcelular de CLA1.

Para confirmar las predicciones teóricas sobre la localización subcelular de la proteína CLA1 se realizó un experimento tipo Western (Figura 12) con extractos protéicos totales de hoja de espinaca (carril 8) y extractos protéicos totales de cloroplastos aislados de hoja de espinaca (carril 9). Como se puede observar, la proteína inmunoreactiva se encuentra mas concentrada en cloroplasto (carril 9), en comparación con hoja (carril 8).

Esto apoya la hipótesis de que la proteína CLA1 es mas abundante en el cloroplasto, donde cumple su función .

CLA1 en el desarrollo de la planta.

Las plantas durante su desarrollo van cambiando de necesidades y funciones. Para que los cloroplastos lleguen a su madurez, pasan por una serie de etapas de desarrollo donde se producen las proteínas, lípidos y pigmentos necesarios para el ensamblaje del aparato fotosintético. Los proplástidos que se localizan en las células meristemáticas se diferencian a cloroplastos capaces de realizar la fotosíntesis. Los cloroplastos, a su vez se dividen de dos a cuatro veces alcanzando un número máximo en las células adultas (Smallwood *et al.*, 1996).

Muchos genes fotosintéticos nucleares se expresan cuando los cloroplastos son funcionales (Taylor, 1989). Mediante un experimento tipo Northern, (Pedrero, 1994) se encontró mensajero de CLA1 en raíz, y la señal fué mucho mas intensa en raíces de plantas adultas (30 días) que en las de plantas juveniles (15 días). Observando los carriles 1, 2, 3 y 5 del experimento tipo Western (Figura 12) , vemos que CLA1 se encuentra en mayor cantidad en función de la edad. En semillas no se detecta señal, ni tampoco en raíces. Si en la raíz hay mensajero, pero no se detecta la proteína, puede ser que los niveles del producto de traducción de CLA1 sean muy bajos y por ello no se detecte señal.

Por estudios que se han realizado sobre acumulación de clorofila en función de la edad (Chory *et al.*, 1991) y estudios sobre el desarrollo membranal (Anderson and Beardall, 1991) se sabe que a los cinco días las plantas todavía no comienzan a realizar la fotosíntesis, las plantas juveniles de doce días ya comenzaron a realizar este proceso y las plantas adultas lo realizan plenamente. Aunque CLA1 se encuentra en plantas de distintas edades, en plantas con mayor actividad fotosintética encontramos mayor concentración (Figura 12, carriles 1-3,5). Esto habla de que CLA1 es necesaria durante el desarrollo, pero también para el funcionamiento del sistema fotosintético.

CLA1 en distintos tejidos de *Arabidopsis*.

En tejido verde, como ya se mencionó, se detecta una banda de 57KDa. Sabemos por experimentos tipo Northern que el RNA mensajero de CLA se encuentra en raíz de plantas maduras y no se encontró señal en plantas juveniles (Pedrero, 1994). En el carril correspondiente a extractos de raíz del experimento tipo Western (Figura 12) no se detecta ninguna señal. Puede ser que la proteína se encuentre presente en raíz en niveles no detectables con la técnica utilizada, o que no se traduzca en las condiciones ensayadas.

Proteínas similares a CLA1 en otros organismos.

Dado el fenotipo letal de la mutante *cla1-1* y la similitud de la secuencia del gen *CLA1* con un marco de lectura abierto de la bacteria fotosintética *Rhodobacter capsulatus* (Pedrero, 1994), se piensa que dicho gen debe tener un papel indispensable para el funcionamiento del sistema fotosintético y debe tener homólogos en otros organismos fotosintéticos.

Curiosamente, CLA1 no se parece únicamente a secuencias pertenecientes a organismos fotosintéticos, también comparte un alto porcentaje de identidad con ciertas secuencias de eubacterias (Tabla 1). La función de CLA1 podría ser la misma que la de secuencias similares en eubacterias. ¿CLA1 está involucrada en rutas metabólicas similares a su homólogo eubacteriano?. Quizá los ancestros de los organismos fotosintéticos utilizaban una proteína homóloga a CLA1 para lo mismo que lo siguen utilizando las bacterias, y cuando aparecieron las cianobacterias comenzaron a utilizar a CLA1 para sus nuevas necesidades.

Mediante un experimento tipo Northern (Pedrero, 1994) se encontró que hay un mensajero homólogo al de *CLA1* en col, frijol, maíz y tabaco. En este trabajo se encontraron secuencias protéicas teóricas reportadas en el Genbank homólogas a CLA1 en otras plantas: arroz, pino, menta y ricino. Además se encontraron antígenos inmunoreactivos en maíz, pino y espinaca mediante el experimento tipo Western (figura 12). Los anticuerpos obtenidos contra CLA1 reconocen una banda con migración aparente de 57 KDa en todos los carriles correspondientes a extractos protéicos totales de tejido verde de plantas. El peso aparente de CLA1 y la proteína inmunoreactiva de otras plantas es de 57 KDa. El peso teórico esperado es mayor (71KDa). También se detecta una banda a la altura de 70 KDa en todas las plantas, pero es muy tenue, incluso se ve con mayor claridad en los extractos de la mutante *cla1-1*. Debe ser otra proteína que al tener epítopes similares a los de CLA1 es reconocida por los anticuerpos. En el carril 6, correspondiente a la mutante, se detecta una banda muy tenue a la misma altura que en el tejido verde de la planta silvestre debida probablemente al paso de una pequeña cantidad de muestra del carril 7. También se presenta una señal tenue aproximadamente de 70 KDa.

En los carriles del experimento tipo Western con extractos de *Rhodobacter sphaeroides* y *Escherichia coli* se presentan bandas con intensidad y peso similares entre si de 78 KDa detectadas por los anticuerpos; podría tratarse de otra proteína que también cruce con los mismos. En *Escherichia coli* hay otra banda con un peso aparente de 65 KDa, el peso de la 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa (Sprenger *et al*, 1997) coincide con el peso de esta proteína. En *Rhodobacter* se detecta otra banda, de 59 KDa que podría ser el homólogo de CLA1 en dicha bacteria. Además de las bandas ya mencionadas, hay otras mas pequeñas tanto en *Rhodobacter* como en *E.coli* que podrían ser productos de degradación de las mayores u otras proteínas que reconocen los anticuerpos.

Finalmente, en *Saccharomyces cerevisiae*, cuyo genoma se encuentra completamente secuenciado, no se encontró ninguna secuencia con alta similitud a CLA1 al realizar una comparación mediante el programa TFASTA de "GCG". En el Western tampoco se encuentra señal en el extracto de proteínas totales de levadura.

Hacia la función de CLA1

Al realizar la búsqueda de secuencias similares a CLA1 en los bancos de genes, se encontró que las secuencias más parecidas cuya función se conoce corresponden a las enzimas dependientes de tiamina difosfato (TPP): la transcetolasa (TK) y al componente E1 del complejo multienzimático de la piruvato deshidrogenasa. Ambas enzimas catalizan la transferencia de un radical con dos carbonos de una molécula a otra. De acuerdo con la similitud estructural

con estas proteínas, CLA1 tendría una función de catálisis en la transferencia de carbonos de una molécula a otra. En las transcetolasas hay secuencias con residuos importantes para la catálisis, como son los que interaccionan con el TPP o con el ión Ca^{2+} . En CLA1 y sus homólogas encontramos estas secuencias características de la transcetolasa.

Análisis más recientes muestran que CLA1 es altamente similar a una nueva clase de transcetolasas encargada de catalizar la formación de 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato (Sprenger *et al*, 1997; Lois *et al*, 1998 y Lange *et al*, 1998). Una de ellas está codificada en el marco de lectura *f620* de *E.coli* con el cual tiene un 48% de identidad (Lange *et al*, 1998) y es parte de una vía metabólica independiente de mevalonato para la síntesis de isoprenoides. El marco de lectura *f620* mencionado se muestra en la tabla 1 con clave de acceso U82664 al GenBank. CLA1 codifica para una enzima que funciona como 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa (Estévez *et al*, comunicación personal). rante sssssssssssssXpara el desarrollo y funcionamiento del aparato fotosintético. Esta proteína está en muchas plantas y en algunas bacterias fotosintéticas y muy probablemente en otros organismos fotosintéticos. Al bloquear la función de este gen en la mutante *clal-1* vemos un fenotipo que hace pensar en que si CLA1 es parte de la vía para la síntesis de isoprenoides en *Arabidopsis*, esta planta no tiene otra alternativa para sintetizar sus pigmentos y por eso tiene un fenotipo albino y una carencia en desarrollo y estructuración en su aparato fotosintético.

Perspectivas.

La existencia de una vía alterna para la síntesis de isoprenoides abre preguntas como: ¿cómo llegó al núcleo ese gen?, ¿porqué no está en levadura? ¿pueden salir del cloroplasto los isoprenoides sintetizados por esta vía? .

Además, pueden hacerse estudios mas finos para encontrar información sobre el papel de los pigmentos en la estructuración del aparato fotosintético.

APENDICE A.Soluciones

Soluciones que se utilizaron en los experimentos:

Towbin: Tris 25mM, Glicina 192mM, Metanol 20%.

TBST: Tris HCl pH8 10mM, NaCl 150mM, Tween 20 0.05%.

TBS: Tris HCl pH8 10mM, NaCl 150mM.

Amortiguador AP: Tris HCl pH9.5 100mM, NaCl 100mM, MgCl₂ 5mM.

Solución de sustratos: en 5ml de amortiguador AP se mezclan 33 ml de cloruro de azul de nitrotetrazolio (NBT) y 16.5ml de BCIP: 5-bromo-4-cloro-3-indoil fosfato.

TE: Tris.HCl (pH 8.0) 10mM.

TBE 5X por litro: trisma base 54g, ácido bórico 27.5g, EDTA 0.5M (pH8) 20 ml.

LBpor litro: bactotripton 10g, extracto de levadura 5g, NaCl 10g.

Medio de cultivo para levaduras YPD:Extracto Bacto-Yeast 1%, Bacto-peptona 2%, Glucosa 2%, Bacto-agar 2%.

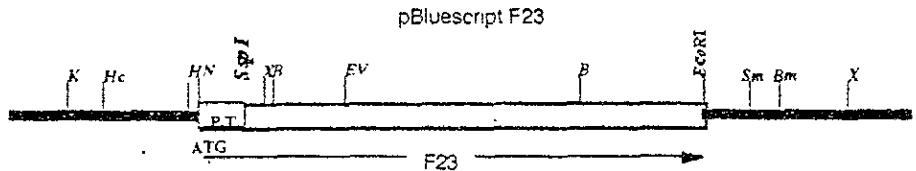
Buffer A: tris-HCl pH 7.5 50mM, MgCl₂ 5mM, DTT 1mM, PMSF 1mM.

Solución tampón ácida para elución de anticuerpos: (glicina 0.2M pH 2.5+ NaCl0.5M+ tween-20 al 0.5%).

Buffer B: 0.35M de sorbitol, 50mM tris pH8 ,0.5M de EDTA, 0.1% BSA, 5mM de b-Mercaptoetanol.

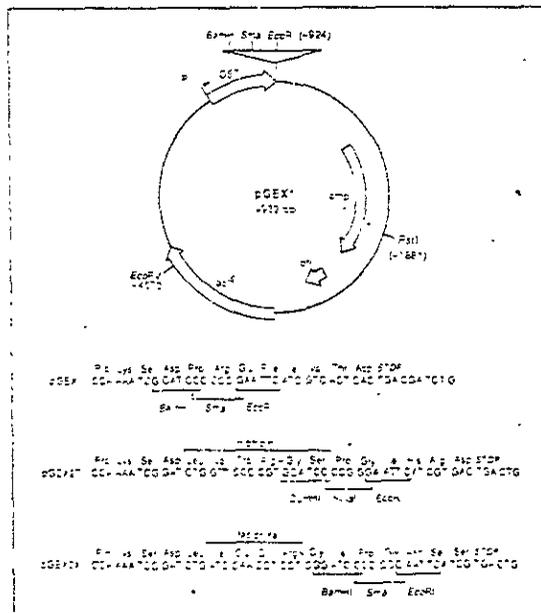
Mapas de los plásmidos utilizados:

Los plásmidos que se utilizaron en la metodología son los siguientes:



Esquema del plásmido pBluescriptF23. Este plásmido contiene el cDNA del gen *DEF-1*. sitios de restricción: *K*, *Kpn I*, *Hc*, *Hinc II*, *H. Hind III*, *X. Xba I*, *B. Bgl II*, *EV, Eco RV*; *EI. Eco RI*, *S: Sma I*, *Bm. Bam HI*. péptido de tránsito a cloroplasto (P.T.). Codón de inicio de la traducción (ATG).

El plásmido pGEX-3:



APENDICE B. Protocolos.

Geles de agarosa

Para las separaciones electroforéticas de DNA se utilizaron geles de agarosa al 1% en TBE 0.5% y se aplicó una diferencia de potencial entre 60 y 120V hasta obtener una migración adecuada de los colorantes. Como marcadores de peso molecular se utilizó DNA del fago λ digerido con la enzima de restricción *Pst* I, que produce fragmentos de peso molecular conocido.

Purificación del fragmento de cDNA de *CLA1*.

Se utilizó una clona de cDNA completa (F23) en Bluescript KS(+), con el fin de purificar el fragmento elegido para la clonación en el vector de expresión. Esta clona fue digerida con las enzimas *Ssp*I/*Eco*RI para obtener un fragmento de 2030pb, que va desde muy cerca del inicio del supuesto péptido de tránsito a cloroplasto hasta el final del cDNA de *CLA1*. Se purificó este fragmento a partir de un gel de agarosa, posteriormente a la separación electroforética, se cortó la banda del gel correspondiente, se separó la agarosa con fenol, se extrajo con agua el DNA y se hizo precipitar con acetato de amonio/etanol. Mientras tanto, el vector fue digerido primero con *Sma* I, se extrajo con fenol, se precipitó con etanol y acetato de amonio, se digirió con *Eco*RI, finalmente, se trató con fosfatasa alcalina, se inactivó la fosfatasa con EDTA y calor (70°C) durante cinco minutos tras lo cual se purificó nuevamente por extracción y precipitación.

Digestiones

El DNA (hasta 1mg) se colocó en 10 μ l de una solución tampón correspondiente a cada una de las enzimas de restricción que se utilizaron, se agregó una unidad de enzima para cada mg de DNA a digerir y se incubó a 37°C durante una hora hasta que la digestión estuviera a término.

Transformación

Para realizar las transformaciones de diversas cepas de *E. coli* se prepararon las células competentes siguiendo un protocolo en el que se utiliza cloruro de calcio 0.1M para volver permeable la pared celular. Ya preparadas las células competentes se agregaron aproximadamente 10ng del plásmido incubando en hielo durante 30 minutos (utilizando concentraciones mayores de plásmido no se obtuvieron transformantes). Posteriormente se dió un choque térmico a 42°C durante 40 segundos, se incubó dos minutos más en hielo, se agregó medio de cultivo LB y se incubó a 37°C una hora para permitir la recuperación. Se distribuyeron 100ml del cultivo en una caja Petri con medio LB sólido y el antibiótico de selección, se incubaron a 37°C durante toda la noche.

Clonación de *CLA1* en un vector de expresión.

Para sobreexpresar una proteína se han construido plásmidos que funcionan como vectores de expresión, permitiendo la síntesis de péptidos extraños en *E. coli*, como fusiones con el C-terminal de una glutatión S-transferasa (GST) de 26KDa codificada por *Schistosoma japonicum*. En este trabajo, se pensó utilizar uno de estos plásmidos, el pGEX3 (Smith and Johnson, 1988). Se mezcló el fragmento de DNA correspondiente a *CLA1* y el vector ya preparado para la reacción de ligación como se describe en la purificación de DNA, se agregó DNA ligasa y se incubaron las reacciones durante una noche a 4°C.

Para seleccionar las clonas conteniendo al plásmido con el inserto, se realizó hibridación en colonia. En esta metodología, se utiliza como sonda radiactiva el fragmento de *Eco*RI de una clona de cDNA de *CLA1* (la clona 21 en pKS(+), que contiene 2.1 Kb de cDNA de *CLA1*). Se purificó DNA de algunas colonias que hibridaron y se digirió con *Bam*HI/*Eco*RI. Al analizar mediante una separación electroforética cuales clonas tenían realmente el fragmento de DNA con el tamaño esperado, se encontró que efectivamente, las clonas aisladas contenían el fragmento de 2030 pb insertado en el vector de 5000pb.

Secuencia

La secuencia se realizó siguiendo el método de Sanger (Sanger et al., 1977) modificado por la compañía USB para la enzima Secuencasa II. Se utilizó para ello un oligonucleótido con la secuencia: 5' CAAGTATATAGCATGGCC que se encuentra dentro del gen que codifica a la glutatión-S transferasa, cerca de su extremo 3'.

Gel de poliacrilamida

Las separaciones electroforéticas de proteínas se realizaron en geles discontinuos de poliacrilamida al 8%, 10%, y 12%. El tinte de los geles se realizó siguiendo el método de Laemmli (Laemmli, 1970).

Los marcadores de peso molecular (PM) que se utilizaron son: miosina (200,000Da), β -galactosidasa (116,250Da), fosforilasa B (97,400Da), albúmina bovina (66,200Da), ovalbúmina (45,000Da) y anhidrasa carbónica (31,000Da).



Figura 13. Marcadores de peso molecular.

Extractos de proteínas totales a partir de cultivos de *E.coli*.

Se hicieron cultivos de la cepa de *E.coli* y incubados toda la noche a 37C con agitación. A la mañana siguiente se diluyó 1:5 el mencionado cultivo con medio LB, se incubó 1h a 37C, tras lo cual se agregó IPTG a una concentración final de 2mM (condición de inducción) y se se incubó a 37C durante dos horas más. El cultivo se centrifugó y la pastilla se resuspendió en 125ml de agua, se sonicó dando pulsos de 30 segundos hasta que las muestras se volvían transparentes. El lisado se centrifugó a 14000rpm en una microfuga, la pastilla se resuspendió en 125ml de agua y se agregó el mismo volumen de buffer de carga (Laemmli, 1970) para depositar en cada pozo de un gel 20ml de la muestra.

Aislamiento de proteínas de cloroplasto.

Se esterilizaron las hojas limpias con clorox al 10% frío, y se lavaron dos veces con agua destilada estéril. Se homogenizó en licuadora dos veces por períodos de cinco segundos (para 95g de tejido 330ml de buffer B. Se centrifugó 10 minutos (para separar los núcleos). Se centrifugó el sobrenadante a 1020xg 15 minutos. Los cloroplastos quedan en la pastilla y se resuspenden en TE.

Obtención de tejido vegetal.

El tejido de *Arabidopsis* se obtiene sembrando semillas de el ecotipo RLD en medio de germinación GM y se cosecha a las edades de 5 días (plántulas), 12 días (plantas juveniles) y 30 días (plantas adultas) congelando inmediatamente con nitrógeno líquido.

La extracción de proteínas totales de todas las plantas y de *Rhodobacter capsulatus* se realizó homogenizando en un buffer con fosfato de sodio 5mM pH 7 y 1.0% p/v de polivinilpirrolidona. A 1ml de tejido hecho polvo se adicionan 300 ml de buffer para centrifugarlo a 7000 durante 10 min.

Las proteínas se cuantifican utilizando el método descrito por Bradford en 1976.

Cultivo de levaduras.

Se hace un cultivo de toda la noche de *Saccharomyces* en YPD, se centrifuga cinco minutos a 10000 rpm. Se resuspende en 25 ml de buffer A. Se agrega buffer de carga (Laemmli, 1970). Se hierve cinco minutos. Se centrifuga a 14000 rpm/10 min en el cuarto frío.

Obtención y purificación del producto de traducción de CLA1.

Inicialmente se pensó utilizar para la sobreproducción de CLA1 el vector pGEX-1, donde la proteína CLA1 quedaba en fase con la proteína GST y se podría purificar por afinidad con glutatión. Al secuenciar nos

dimos cuenta de que el vector que se nos había facilitado como pGEX-1, en realidad era el pGEX-3. Al desfasarse CLA1 ocurrió lo siguiente: a 60 aminoácidos del sitio de clonación se trasladaron un codón de término en la fase de lectura 1, con un codón de inicio en la fase de lectura 3 como se muestra en la figura 14.

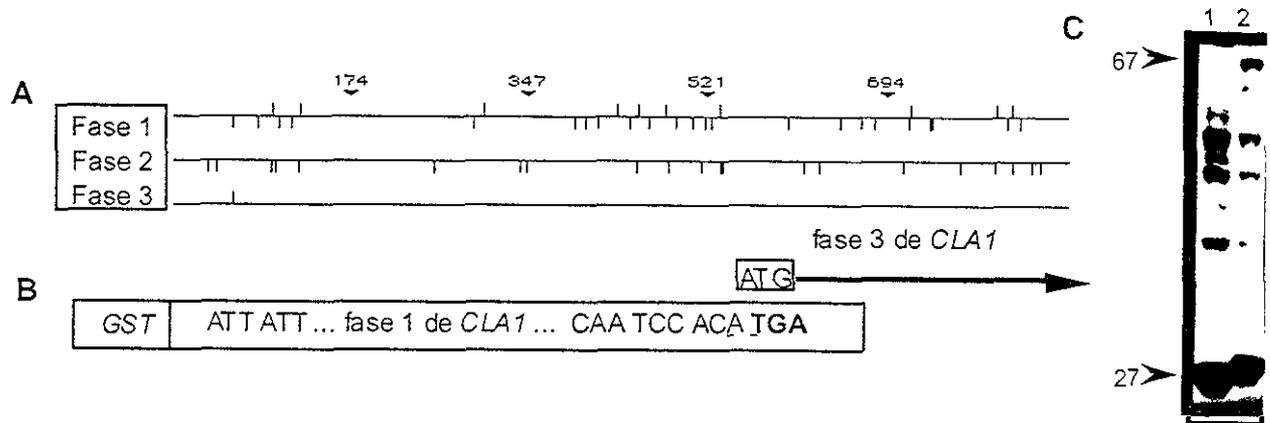


Figura 14 A. Marcos de lectura abiertos 1 y 3 del gen CLA1 a partir del sitio de corte por la enzima Ssp I. Las rayas verticales sobre la horizontal representa codones de inicio de la traducción, las que se encuentran hacia abajo representan codones de término de la traducción. B. Esquema donde se muestra el traslape de los codones de término (TGA) e inicio de la traducción (ATG) de las fases de lectura uno y tres respectivamente del gen CLA1 en el plásmido pCLA28. C. Gel donde se separaron extractos protéicos de : Carril 1 . Cultivo de *E.coli* dH5 α incubado por dos horas con IPTG . Carril 2. Clona CLA28 incubada 2 horas con IPTG.

Este arreglo de los codones de término e inicio de la traducción se ha reportado en regiones genómicas como la siguiente: El codón de terminación del gen *D* del bacteriófago jX174 coincide por un nucleótido con el codón de inicio del gen *J* (Barrel *et al.*, 1976). Recientemente se han descrito otros casos de genes traslapados, como es el de una proteína para la producción de un pigmento café-rojizo en *Streptomyces griseus*, donde el codón de término del gen *rppA* y el de inicio de *rppB* se traslapan, generándose una proteína tipo chalcona sintasa y otra similar a una proteína de 33KDa de adenovirus (Ueda *et al.*, 1995). Al analizar los extractos protéicos totales de la clona CLA 28 en un gel desnaturante de poliácridamida que se muestra en la figura 14 se observó que se obtenían dos proteínas sobreproducidas al inducir con IPTG; una correspondiente a GST mas el pequeño fragmento codificado en el segmento de ADN anterior al codón de término y otra de 67KDa correspondiente a CLA1 a partir del ATG de la fase tres que se muestra en la figura 14

Cortes con sulfato de amonio.

En esta técnica se agregó sulfato de amonio poco a poco y con agitación a diferentes porcentajes de saturación para qprecipitar las proteínas, después se centrifugó a 14000 rpm en una microfuga para recuperarias y la pastilla se resuspendió en agua.

Diálisis.

Después de realizar los cortes con sulfato de amonio, o en cualquier ocasión que se necesitara separar las proteínas de ciertas sales, se virtió la solución salina en una bolsa de diálisis y se colocó en una cantidad 100 veces superior en volúmen de una solución de tris 30mM, PMSF 1mM, EDTA 1mM, β - mercaptoetanol 0.04%, se agitó a 4°C durante una hora y se cambió la solución. Se recuperó el líquido de interés con una jeringa.

Purificación de la proteína a partir de un gel

Una vez realizada una separación electroforética de la mezcla de proteínas, se buscó la banda del peso adecuado y se recortó con una navaja.

Electroelución

Para eluir la proteína del gel, se incubó el trozo de gel con la muestra durante una noche con Buffer Tris-Glicina 0.1X, SDS 2.5%. Dentro de la celda se colocó la muestra cubriendo con buffer Tris Glicina 0.1X y fuera, en la cámara se vertió buffer tris-glicina 1X. Se conectó a una fuente de poder donde se le aplicó 3W durante aproximadamente dos horas (hasta que todo el colorante migra concentrándose). Se succiona la muestra con una jeringa.

Inoculación de un conejo para la obtención de anticuerpos.

Se realizó un sangrado de 10ml antes de inocular el conejo. Esta sangre se reposó dos horas a temperatura ambiente y toda la noche a cuatro grados, se centrifugó y se recuperó el sobrenadante para utilizar ese suero preinmune como control.

Se mezcló la proteína en la solución con un volumen igual de adyuvante completo de Freund y una vez formada una emulsión se inyectó una coneja Nueva Zelanda en cuatro puntos de su cuerpo cercanos a los ganglios.

Se inoculó el conejo tres veces con aproximadamente 200 μ l de proteína, se sangró 10 días después de la última inyección. Se trató el suero y se precipitaron los anticuerpos con sulfato de amonio, que a su vez se purificaron por inmovinoadsorción. Como segundos anticuerpos se utilizaron anticuerpos anti IgG de conejo acoplados a fosfatasa alcalina. Las inoculaciones se dieron cada 15 días. Se sacaron 4ml de sangre en la primera ocasión, el mismo día de la tercera inoculación y se dió otra sangría de 10 ml 10 días después. Se precipitaron los anticuerpos con sulfato de amonio y se almacenaron a 4C.

Purificación de los anticuerpos.

Se separaron en un gel las proteínas totales de la clona CLA28, se transfieren a una membrana de nitrocelulosa y se tiñen con colorante Ponceau para localizar la proteína CLA1, se cortó esa sección de la membrana y se destiñó con agua, se bloqueó con una solución de leche descremada al 5% en TBST, se incubó con una solución conteniendo la mezcla de anticuerpos en TBST durante una noche, se recuperó el anticuerpo incubando durante cuatro minutos en la solución tampón ácida, se neutralizó con una solución de Tris 1M a la cual no se le ajustó el pH, se completó a un volumen de 10ml con TBS y se utilizó para experimentos tipo Western.

Ensayo tipo Western

Primero se hizo una separación electroforética de la mezcla proteica, una vez terminada, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa dentro de una cámara de transferencia, con buffer Towbin, aplicando una corriente de 460mA durante tres horas a 4°C con agitación. Se incubó durante una hora en una solución de leche en TBST para bloquear, con agitación. Se incubó una hora con la solución del primer anticuerpo en TBST. Se incubó 1/2 hora con anti IgG de conejo también diluido en TBST.

Se lavó dos veces durante 5 minutos con solución de TBST. Se reveló con una solución recién preparada en buffer AP, NBT y BCip.

Se probaron diluciones desde 1/500 hasta 1/16000, con el suero preinmune, no hubo reacción alguna.

BIBLIOGRAFIA

Adamska I., Scheel B. and Kloopstech K. (1991). Circadian oscillations of nuclear-encoded chloroplast protein in pea (*Pisum sativum*). *Plant Mol Biol*, 17, 1055-65.

Altschul S.F., Stephen F., Gish W., Miller W., Myers W.E., and Lipman D. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215, 403-10.

Anderson J. and Beardall J. (1991). Molecular activities of plant cells. Blackwell Scientific publications, Cap 3, 21, 36-49.

Archer E.K. and Keegstra K. (1993). Analysis of chloroplast transit peptide function using mutations in the carboxyl-terminal region. *Plant Mol Biol*, 23, 1105-1115.

Armstrong G.A., Cook D., Ma D., Alberti M., Burke D.H. and Hearst J. (1993) regulation of carotenoid and bacteriochlorophyll biosynthesis genes and identification of an evolutionary conserved gene required for bacteriochlorophyll accumulation.

Barrell B.G., Air G.M. and Hutchison C.A. (1976). Overlapping genes in bacteriophage ϕ X174. *Nature*, 264, 34-41.

Barnes S.A., Nishizawa N.K., Quaggio R.B., Whitelam G.C., Chua N. (1996) Far-red blocks greening in Arabidopsis seedlings via a phytochrome A-mediated change in plastid development. *The Plant Cell*, 8, 601-615.

Bauer C., Buggy J. and Mosley Ch. (1993). Control of photosystem genes in *Rhodobacter capsulatus*. *TIG*, 9 (2), 56-60.

Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254.

Chory J., Nagpal P. and Peto C.A. (1991), Phenotypic and genetic analysis of *det 2*, a new mutant that affects light-regulated seedling development in *Arabidopsis*. *Plant cell*, 3, 445-459.

Cornwell K.L. and Keegstra K. (1987). Evidence that a chloroplast surface protein is associated with a specific binding site for the precursor to the small subunit of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase. *Plant Physiol*, 85, 780-785.

Dyada F., Furey W. Swaminathan S., SaxM., Farrenkopf B. and Jordan F. (1993) Catalytic centers in the thiamin diphosphate enzyme pyruvate decarboxylase at 2.4A resolution. *Biochemistry* 32, 6165-6170.

Ehleringer J.R., Sage R.F., Flanagan L.B. and Pesarcy R.W. (1991).Climate change and the evolution of C4 photosynthesis. *TREE*, 6, 94-99.

Feldman K.A. (1991).T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis* : mutational spectrum. *Plant J*,1, 71-82.

Feldman K.A. and Marks M.D.*Agrobacterium* -mediated transformation of germinating seeds of *Arabidopsis thaliana* : A non-tissue culture approach. *Mol Gen Genet*, 208, 1-9.

Gallardo F. , Miginac-Maslow M. , Sangwan R.S., Decottignies P., Keryer E., Dubois F, Bismuth E., Galvez S., Sangwan-Noreel and Gadai P. (1995).Monocotyledonous C4 NADP(+)-malate dehydrogenase is efficiently synthesized, targeted to chloroplast and processed to an active form in transgenic plants of the C3 dicoyledon tobacco. *Planta*, 197, 324-332.

Giuliano G., Hoffman N.E., Scolnik P.A. and Cashmore A. (1988).A light entrined circadian clock controls transcription of sevelral plant genes. *The EMBO Journal*, 7, 3635-3642.

Glynias R.J. (1990).Gene Works Program. Apple Computer Group.

Govindjee R. and Coleman J. W. (1990). How Plants make Oxigen. *Scientific American*, 42-51.

Gray M. W. (1993). Origin and evolution of organelle genomes. *Current opinion in Genetics and Development*, 3, 884-890.

Gruissem W. and Tonkyn J.C. Control mechanisms of plastid gene expression. *Cri Rev in Plant Sci*, 12, 19-55.

Hall D.O. and Rao, K.K. (1994).Photosynthesis (5th ed). Cambridge University Press.

Hatch M.D. (1992). C4 Photosynthesis: an unlikely process full of surprises. *Plant Cell Physiol*, 33, 333-342.

Horniak L., Pilon M. Van't Hof R and de Kruijff B. (1993). The secondary structure of the ferredoxin transit sequence is modulated by its interaction with negatively charged lipids. *FEBS Lett*, 334, 241-246.

Howe Ch.J., Beanland T.J., Larkum W.D. and Lockhart P.J. (1992). Plastid origins. *TREE*, 7, 378-383.

Johnson C.H., Knight M.R., Kondo T., Masson P., Sebrook J., Haley A. and Trewavas A. (1995). Circadian oscillations of cytosolic and chloroplastic free calcium in plants. *Science*, 269, 1863-1865.

Keegstra K. and Olsen L. (1989). Chloroplastic precursors and their transport across the envelope membranes. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 40, 471-501.

Lange B.M., Wildung M., Mc Casakill D. and Croteau R. (1998) A family of tranketolases that directs isoprenoid biosynthesis via mevalonate-independent pathway. *Procl Natl Acad USA*. 2000-2104.

Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.

Lehninger A.L. Second edition (1981) Biochemistry. Worth Publishers, Inc. NY.

Lessard I.A.D. and Perham R.N. (1994) Expression in *Escherichia coli* of genes encoding the E1a and E1b subunits of the pyruvate dehydrogenase complex of *Bacillus stearothermophilus* and assembly of a functional E1 component ($\alpha\beta_2$) in vitro.

Lilburn T.G., Haith C.E., Prince R.C. and Beatty J.T. (1992). Pleiotropic effects of pufX gene deletion on the structure and function of the photosynthetic apparatus of *Rhodobacter capsulatus*. *Biochim Biophys Acta*, 1100, 160-170.

Lindqvist I. Schneider G., Ermiler U. and Sundström M. (1992) Three-dimensional structure of transketolase, a thiamine diphosphate dependent enzyme, at 2.5 Å resolution. *The EMBO Journal*, 11, 2373-2379.

Lockhart P.J., Howe C.J., Bryant D.A. Beanland T.J. and Larkum A.W. (1992). Substitutional bias confounds inference of cyanobacterial origins from sequence data. *J Mol Evol*, 34, 153-62.

Lois L.M. , Campos N., Putra R.S., Danielsen K., Rohmer M. and Boronat A. (1998) Cloning and characterization of a gene from *Escherichia coli* encoding a transketolase-like enzyme that catalyzes the synthesis of D-1-deoxyxylulose 5-phosphate, a common precursor for isoprenoid, thiamin and pyridoxol biosynthesis. *Proc Nat Acad Sci USA*. 2105-2110.

Mandel M.A., Feldmann K.A., Herrera-Estrella L. Rocha-Sosa M, Leon P. (1996). CLA12, a novel gene required for chloroplast development is highly conserved in evolution. *Plant J*, 9, 649-658.

Margulis L. y Schwartz K. (1981). Cinco reinos. Guía ilustrada para los phyla de la tierra. Edición Ciencias.

Matheus M. and Van Holde K. (1991). Biochemistry. The Benjamin Cummings Publishers,

Mullet John E. (1988). Chloroplast development and gene expression. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 39, 475-502.

Nakai K. (1991). Predicting various targeting signal amino acid sequences. *Bull Inst Chem Res Kyoto Univ*, 69, 269-291.

Nakai, K and Kanehisa, M. (1992). Knowledge base for predicting protein localization sites in eucaryotic cells. *Genomics*, 14, 897-911.

Needleman and Wunsch. (1970). A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J Mol Biol*, 48, 443-453.

Newcomb E. (1990). The general cell. The biochemistry of plants. A comprehensive treatise. *Academic Press*, 193-196.

Nikkola M, Lindquist Y. and Schneider G. (1994). Refined structure of transketolase from *Saccharomyces cerevisiae* at 2.0 Å resolution. *J Mol Biol*, 238, 387-404.

Packman L.C., Hale G. and Perham R.M. (1984). Repeating functional domains in the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex of *Escherichia coli*. *The EMBO Journal*, 3, 1315-1319.

Pain D., Kanwar Y.S. and Blobel G. (1988). Identification of a receptor for protein import into chloroplasts and its localization to envelope contact zones. *Nature*, 331, 232.

Pedrero-Hernández G. (1994). Caracterización de clonas del cDNA de un gen involucrado en el desarrollo del cloroplasto de *Arabidopsis thaliana*. TESIS. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO FACULTAD DE QUIMICA.

Piechulla B., (1993). 'Circadian clock' directs the expression of plant genes. *Plant Molecular Biology*, 22, 533-542.

Portis A.R., Jr. (1982). Introduction to photosynthesis. Development, Carbon metabolism and Plant Productivity, II. Academic Press, 1-10.

Possingham, J. (1980). Plastid replication and development in the life cycle of higher plants. *Ann Rev Plant Physiol*, 31, 113-29.

Raven P.H., Evert R.F. and Eichhorn S.E. (1992). Biology of plants. Fifth edition. Worth publishers.

Robinson B.H. and Chun K. (1993). The relationships between transketolase, yeast pyruvate decarboxylase and pyruvate dehydrogenase of the pyruvate dehydrogenase complex. *FEBS Lett*, 328, 99-102.

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

Smallwood M. Knok J.P. and Bowles D.J. (1996) Membranes: specialized functions in plants. Chapter 25 Chloroplast development and division. Scientific publishers 442-457.

Schneil D.J. Blobel G. and Pain D. (1990).The chloroplast import receptor is an integral membrane protein of chloroplast envelope contact sites. *J Cell Biol*, 111, 1825-38.

Sganga M. and bauer C. (1992).Regulatory factors controlling photosynthetic reaction center and light harvesting gene expression in *Rhodobacter capsulatus*. *Cell*, 68, 945-954.

Smeekens S., Bauery C., Hageman J., Keegstra K. and Weisbeek P. (1986).The role of the transit peptide in the routing of precursors toward different chloroplast compartments'. *Cell*, 46, 365-375.

Smith D.B. and Johnson K.S. (1988).Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene*, 67, 31-40.

Sprenger G., Shörken U., Wiegert T., Grolle S., de Graaf A.A., Taylor s., Begley T., Bringer-Meyer S. and Sahn H. (1997) Identification of a thiamin-dependent synthase in *Escherichia coli* required for the formation of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate precursor to isoprenoids, thiamin and pyridoxol. *Procl Natl Acad Sci USA*. 94, 12857-12862.

Sulli Ch.a and Shwartzbach S.D. (1996).A soluble protein is imported in to Eugelena Chloroplast as a membrane bound precursor. *The Plant Cell*, 8, 43-53.

Taiz L. and Zeiger E (1991).Plant Physiology. The Benjamin/Cummings Publishing Company, 219-243.

Terzaghi W.B. and Cashmore A.R. (1995).Light-regulated transcription. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 46, 445-474.

Theg S.M. and Geske F.J. (1992).Biophysical characterization of a transit peptide directing chloroplast protein import. *Biochemistry*, 31, 5053-5060.

Theg S.M. and Scott S.V. (1993).Protein import into chloroplast. *TRENDS in Cell Biol*, 3, 186-190.

Thomson W.W and Whatley J.M. (1980).Development of nongreen Plastids. *Ann Rev Plant Physiol*, 31, 375-394.

Ting I. P. (1985).Crassulacean acid metabolism. *Ann Rev Plant Physiol* ,36, 595-622.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Ueda K., Kim K.M., Beppu T. and horinouchi S. (1995). Overexpression of a gene cluster encoding a chalcone synthase-like protein confers redbrown pigment production in *Streptomyces griseus*. *J Antibiot* (Tokyo), 48, 638-646.

Van't Hof R., Demel R.A., Keegstra K. and de Kruijff B. (1991). Lipid-peptide interactions between fragments of the transit peptide of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase and chloroplast membrane lipids. *FEBS*, 291 (2), 350-354.

Wallis N.G. and Perham R. N. (1994) Structural dependence of post-transational modification and reductive acetylation of the lipoyl domain of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex *J.Mol.Biol.* 236, 209-216.

Youvan D.C. (1984). Nucleotide and deduced polypeptide sequences of the photosynthetic reaction-center, B870 antenna, and flanking polypeptides from *R capsulata*. *Cell*, 37, 949-957.