

00551  
1

UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UN/M  
POSGRADO 



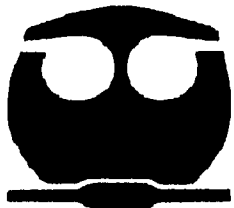
FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

**“UNIÓN DE LA 24RNP A  
DIFERENTES 3’UTRs DE MENSAJES  
DE CLOROPLASTO DE ESPINACA”**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :  
**MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)**  
**P R E S E N T A :**  
**CATALINA ARENAS HUERTERO**

Tutora: DRA. HERMINIA LOZA TAVERA



MÉXICO, D. F.

Diciembre 2003

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

A



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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	Dra. Estela Sánchez de Jiménez	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez	Facultad de Medicina, UNAM
Secretario	Dra. Rosa María del Ángel	CINVESTAV, IPN
Suplente	Dr. Jesús Aguirre Linares	I. de Fisiología Celular, UNAM
Suplente	Dr. Jesús Valdés Flores	CINVESTAV, IPN

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Catalina Arenas

FECHA: 18 - Noviembre - 2003

TESIS CON  
FALSA PROTECCIÓN

3

# “UNIÓN DE LA 24RNP A DIFERENTES 3’UTRs DE MENSAJES DE CLOROPLASTO DE ESPINACA”

## RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección de la Dra. Herminia Loza Tavera en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Conjunto E, de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Herminia Loza Tavera	Facultad de Química, UNAM
Dra. Patricia León Mejía	Instituto de Biotecnología, UNAM
Dra. Rosa María del Ángel	CINVESTAV, IPN

Se reconoce la colaboración y asesoría académica del Dr. Rafael Moreno Sánchez, del Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología, en cuyo laboratorio se llevó a cabo los experimentos de análisis de la desnaturalización del RNA. A la Dra. Rosa María del Ángel del Departamento de Patología Experimental del CINVESTAV-IPN por su asesoría en el montaje de la técnica de geles de retardo. Así también se reconoce la asesoría académica en diferentes aspectos del proyecto al Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez de Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM, en el análisis matemático de los resultados y a la Dra. Rosario Muñoz Clares del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM por sus valiosos comentarios.

Se reconoce la asesoría técnica del M. en C. Martín Vargas Suárez en los experimentos realizados durante el proyecto.

El proyecto fue apoyado económicamente por DGAPA PAPIIT (IN225001) y PAIP-FQ-UNAM 6290-04.

Agradezco a los miembros del jurado, la lectura y corrección de la presente tesis.

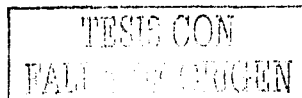
## AGRADECIMIENTOS

A mi Familia:

- A mi Madre, Catalina Huertero por que sus enseñanzas las llevo conmigo y son parte de mi ejemplo.
- A mi Padre, Alfredo Arenas Olmos por compartir conmigo todas estas experiencias, por su cariño, comprensión, amistad, confianza, aventuras y preocupaciones. Por el gran apoyo en cualquier momento.
- A mis hermanitos, Evangelina, Susi, Luisa, Alfredo, Francisco, Cynthia y Luis por el apoyo, paciencia y cariño incondicional.
- De manera especial a Lina, Luis y Cynthia porque han estado muy cerca de mi corazón, por todas sus palabras de aliento y confianza. A Paco por tener esa amistad tan especial.
- A mis sobrinitos: José Luis, Isai, Lluvia, Alfredo, Ana Luisa, José María, Erick e Itzel por la chispa que ponen a mi vida.

A mis Amigos:

- A Herminia Loza por darme la oportunidad de estar en el laboratorio. De conocerla, aprender junto con ella. Y por su paciencia para permitirme desarrollar ante cualquier adversidad el proyecto.
- A mis amigos Elizabeth, Miguel Angel, Kenia, Martín, Andreita, Javier, Selene y Homero por todo el apoyo y por compartir conmigo todo tipo de situaciones, ¡ah! y por todas las fiestas.
- A los pollitos del laboratorio: Alex, Viri, Denia, Polo y Miguel. A Daniel, Lilia, Agustín, Lore, Carmen y a la señora Chayito; por su amistad y apoyo.
- Por sus valiosos consejos para la vida. A Martín Vargas y a los Doctores Felipe Cruz, Paty Coello, Eleazar Martínez, Rafael Moreno, Juan Pablo Pardo e Irma Bernal.



<b>ÍNDICE</b>	1
<b>ABREVIATURAS</b>	IV
<b>RESUMEN</b>	VI
<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
1. El Metabolismo del RNA.	1
1.1. mRNAs con elementos que responden a hierro. Un modelo de regulación postranscripcional.	1
1.2. mRNAs con elementos ricos en AU, como señal de degradación.	6
1.3. Vías de degradación de mRNAs en mamíferos y levadura.	8
1.4. Factores que determinan inestabilidad en mRNAs citoplásmicos de plantas.	9
2. Control de la expresión genética en el cloroplasto.	9
2.1. Control de la expresión genética a nivel transcripcional.	10
2.2. Control de la expresión genética a nivel postranscripcional.	11
2.3. Procesamiento de los extremos 3'UTRs de mRNAs de cloroplasto.	13
2.4. Regulación de la traducción.	13
2.5. RNPs que interactúan con los 3'UTRs de cloroplasto de espinaca.	16
<b>HIPÓTESIS</b>	19
<b>OBJETIVO</b>	19
<b>ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b>	20
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	22
1. Preparación de los RNAs.	22
1.1. Clonación del extremo 3'UTR del gen <i>psbA</i> de espinaca.	22
1.2. Extremo 3'UTR del gen <i>petD</i> de espinaca.	23
1.3. Síntesis de los moldes para transcribir los diferentes segmentos de los 3'UTRs.	23
2. Producción de proteína recombinante.	26
3. Análisis de proteínas.	29
3.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE).	29
3.2. Tinción de proteínas con plata en geles de SDS-PAGE.	30
4. Transcripción <i>in vitro</i> de los diferentes segmentos de los 3'UTRs.	33
5. Análisis de RNAs.	33
5.1. Electroforesis de RNA en geles de poliacrilamida desnaturizante.	33
5.2. Entrecruzamiento de RNA-proteína con luz ultravioleta (X-UV).	34

5.3. Geles de retardo.	35
6. Análisis matemático de los resultados y cálculos de las constantes de disociación aparentes ( $K_{d_{ap}}$ ).	37
<b>RESULTADOS</b>	<b>38</b>
1. Características de los 3'UTRs.	38
1.1. El 3' UTR de <i>psbA</i> .	38
1.2. El 3'UTR de <i>petD</i> .	39
1.3. Transcripción <i>in vitro</i> de los diferentes segmentos de los 3'UTRs.	39
2. Análisis de la unión de la 24RNP recombinante a los 3'UTRs de <i>psbA</i> y <i>petD</i> <i>in vitro</i> .	42
3. Interacción de la 24RNP con la estructura secundaria de los 3'UTRs.	43
3.1. Análisis teórico de las estructuras secundarias en los 3'UTRs.	44
3.2. Unión de la 24RNP a los 3'UTRs desnaturalizados.	47
3.3. Unión de la 24RNP a los 3'UTRs en presencia de competidor.	48
4. Unión de la 24RNP al 3'UTR de <i>psbA</i> analizada por X-UV.	49
4.1. Unión de la 24RNP al 3'UTR de <i>psbA</i> completo.	49
4.2. Unión de la 24RNP a diferentes segmentos del 3'UTR de <i>psbA</i> .	49
5. Unión de la 24RNP al 3'UTR de <i>petD</i> analizada por X-UV.	52
5.1. Unión de la 24RNP al 3'UTR completo de <i>petD</i> .	52
5.2. Unión de la 24RNP a diferentes segmentos del 3'UTR de <i>petD</i> .	52
6. Unión de la 24RNP a los extremos 3'UTRs completos, analizada por geles de retardo.	54
7. Análisis de la unión de la 24RNP a los diferentes segmentos de <i>psbA</i> y <i>petD</i> , empleando geles de retardo.	57
7.1. Unión de la 24RNP a los segmentos 5' de <i>psbA</i> y <i>petD</i> .	57
7.2. Unión de la 24RNP a los segmentos T-A de <i>psbA</i> y <i>petD</i> .	59
7.3. Unión de la 24RNP a los segmentos 3' de <i>psbA</i> y <i>petD</i> .	60
7.4. Unión de la 24RNP a los segmentos 5' T-A de <i>psbA</i> y <i>petD</i> .	61
7.5. Unión de la 24RNP a los segmentos T-A 3' de <i>psbA</i> y <i>petD</i> .	63
8. Análisis matemático de la unión de la 24RNP a los diferentes segmentos (programa Dynafit).	66
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>72</b>
1. La 24RNP recombinante se une a los 3'UTRs de <i>psbA</i> y <i>petD</i> <i>in vitro</i> .	72
2. Las estructuras secundarias del RNA influyen en la unión de la 24RNP a los 3'UTRs de	72

mensajeros cloroplásticos.	
3. La 24RNP se une de manera cooperativa al extremo completo 3'UTR de <i>psbA</i>	74
4. Por análisis de X-UV la 24RNP se une con mayor afinidad al segmento 3', después del tallo-asa.	75
5. Por análisis de geles de retardo, la 24RNP forma múltiples complejos con los segmentos de <i>psbA</i> y <i>petD</i> .	76
6. Formación de diferentes complejos en la unión a los segmentos de <i>psbA</i> y <i>petD</i> por geles de retardo.	78
7. Cálculo de las constantes cinéticas por análisis matemático.	80
8. Posible mecanismo de unión de la 24RNP a los 3'UTRs de mensajeros cloroplásticos.	81
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>83</b>
<b>PERPECTIVAS DEL PROYECTO</b>	<b>84</b>
<b>APENDICES</b>	<b>85</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>98</b>



## ABREVIATURAS

$^{32}\text{p}$	Isótopo radiactivo de fósforo
3'UTR	Región 3' no traducida
5'UTR	Región 5' no traducida
APS	Persulfato de amonio
ARE	Región rica en A-U
AUF1/hnRNP-D	Ribonucleoproteína D
BSA	Albúmina de suero bovina
CDF2	Factor 2 de unión DNA de cloroplasto
Ci	Curie. l
CTN	Cuentas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DST	Downstream elements
fmol	Femtomo
g	Gramos
h	Horas
hsp70	Proteína de choque térmico
IPTG	Isopropil-tio-b-D-galactósido
IR	Secuencia repetida invertida
IREs	Elementos de respuesta a hierro
IRP	Proteína de respuesta a hierro
kDa	Kilodaltons
L	Litro
LB	Medio Luria-Bertoni
mA	Miliamperes
mg	Miligramos
$\mu\text{g}$	Microgramos
mL	Mililitro
$\mu\text{L}$	Microlitros

mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
nt	Nucleótido
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PKC	Proteína Cinasa C
PvPRP	Pared celular rica en proteínas con prolina
RBD	Dominio de unión a RNA
RNAsa	Ribonucleasa
RNAsin	Inhibidor de Ribonucleasa
RNP	Ribonucleo proteína
rNTPs	Ribonucleótidos trifosfatos
rpm	Revoluciones por minuto
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
s	Segundo
SAUR	Small auxin-up RNA
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SLBPs	Proteínas de unión a tallo-asa
snRNA	Ácido ribonucleico pequeño nuclear
TfR	Transferrina
tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia
X-UV	Entrecruzamiento con luz ultra violeta

TRABAJOS CON  
FALLA DE ORIGEN

## RESUMEN

En la expresión de diverso genes cloroplásticos, las modificaciones postranscripcionales que sufre el mRNA son eventos críticos que regulan la estabilidad de los mensajeros plastídicos. Por ensayos realizados *in vivo* e *in vitro* se sabe que la estabilidad de los mensajes depende tanto de estructuras secundarias tipo tallo-asa encontradas en las regiones 3' que no se traducen (Untranslated regions: 3'UTR), como de proteínas de unión a RNA (RNA binding proteins: RNPs). Se ha descrito la participación de algunas RNPs en el procesamiento de los 3'UTRs de varios mRNAs de cloroplasto de espinaca. Estas RNPs se encuentran asociadas a un complejo proteico de alto peso molecular, que presenta actividades de endo y exonucleasas semejante al degradosoma bacteriano.

La 24RNP es una proteína codificada en el núcleo, que es transportada al cloroplasto y se asocia al complejo de procesamiento de RNA. Con base en los resultados obtenidos en nuestro laboratorio, en relación a la participación de la 24RNP en la estabilidad de los mensajeros cloroplásticos en ensayos de procesamiento *in vitro*; se planteó, como objetivo de este trabajo, la caracterización de la unión de la 24RNP a las regiones de dos mensajes de cloroplasto de espinaca (*petD* y *psbA*), determinar la especificidad de esta unión por alguna región del mensajero.

Los estudios de unión se realizaron empleando 24RNP recombinante y los 3'UTRs completos y varios segmentos de diferentes tamaños, analizándolos por las técnicas de entrecruzamiento con luz ultravioleta (X-UV) y geles de retardo de RNA.

Los resultados indicaron que la 24RNP se unió a los 3'UTRs completos de manera cooperativa. Por la técnica de X-UV, esta proteína mostró mayor afinidad por las secuencias posteriores al tallo-asa (3') en ambos mensajes. Este último resultado puede tener implicaciones fisiológicas de gran importancia, ya que durante el procesamiento de los 3'UTRs este extremo es eliminado. Los ensayos por geles de retardo indicaron que la proteína es capaz de unirse a cualquier región en el 3'UTR, aunque con diferentes afinidades, y que su unión es a través de complejos de diferente tamaño, lo sugiere una diferente composición multimérica para cada uno de estos complejos proteicos.

# INTRODUCCIÓN

## 1. EL METABOLISMO DEL RNA

El metabolismo del RNA comprende los procesos de transcripción, procesamiento, traducción, degradación del RNA y su estabilidad. Estos son procesos conservados evolutivamente, en donde participan tanto secuencias consenso (elementos en *cis*) propias del mensajero, secuencias modificadas postranscripcionalmente por procesamiento (edición, splicing) o la polimerización de nucleótidos (poli-A, poli-G), así como la participación de proteínas (elementos en *trans*) que interactúan con los elementos en *cis*, para regular algunos aspectos del metabolismo del RNA (Anantharaman *et al.*, 2002; Mignone *et al.*, 2002). Las proteínas relacionadas con el metabolismo del RNA comprenden entre el 3 y el 11% del total de proteínas en bacterias, arqueas y eucariotes (Anantharaman *et al.*, 2002).

En un estudio comparativo de las proteínas involucradas en el metabolismo del RNA. Se logró dividir las en dos grupos, de acuerdo con los dominios que presentan. Las proteínas de la clase I presentan dominios enzimáticos y dominios de interacción. La clase II son proteínas no catalíticas, con dominios de unión a RNA (RNA binding domains: RBDs) y algunas con dominios de interacción proteína-proteína las cuales están asociadas con la formación de complejos multi-subunidad (Anantharaman *et al.*, 2002).

### 1.1. mRNAs con elementos que responden a hierro. Un modelo de regulación postranscripcional.

El control de la homeostasis del hierro intracelular es un mecanismo complejo que ha sido ampliamente estudiado en mamíferos, el cual requiere de un sistema de regulación y de detección del hierro intracelular. El hierro se introduce a la célula por medio del receptor de la transferrina (TfR) por un proceso de endocitosis, cuando los niveles de hierro intracelulares son bajos. En condiciones de hierro normales o alto, el exceso de este metal se almacena como ion férrico Fe(III), específicamente como oxi-hidróxido de hierro (FeOOH), el cual se une a la ferritina para su uso en cualquier demanda metabólica (Theil, 1998). La ferritina es una proteína constituida por una mezcla de subunidades de cadena

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# PAGINACION DISCONTINUA

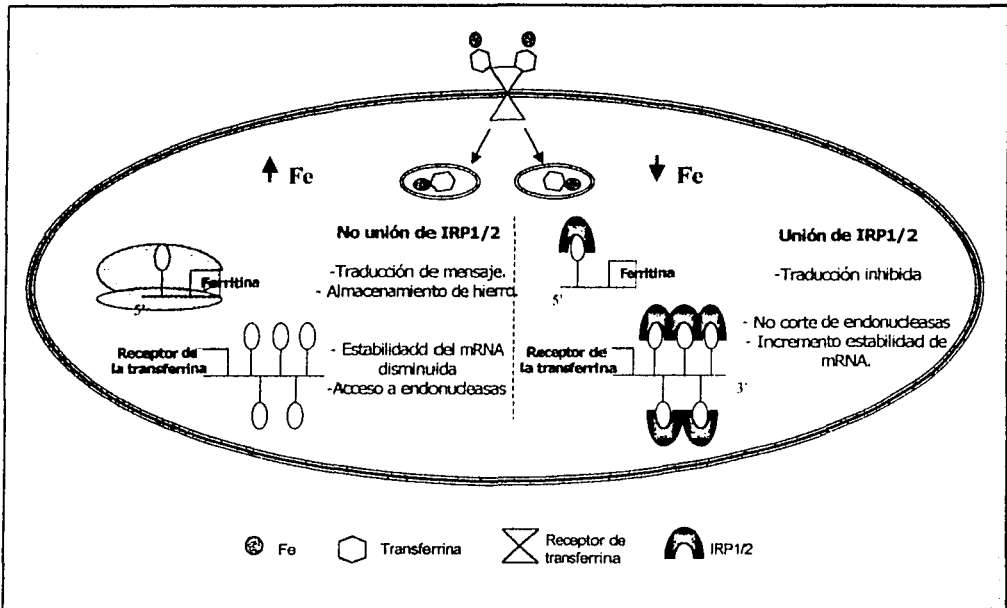
pesada (H) (21 kDa) y de cadena ligera (L) (19 kDa). Los mensajeros de estas proteínas, a su vez, están estrictamente regulados a nivel postranscripcional, ya que presentan, tanto en el 5' como en el 3'UTRs, secuencias que forman estructuras tipo tallo-asa muy estables, las cuales se conocen como elementos de respuesta a hierro (Iron responsive elements: IREs). Se han encontrado IREs en el 5'UTR de los mensajeros de la ferritina, que codifican a la subunidad H como a la L (Theil, 1998), en la 5-aminolevulinato sintasa eritroide (eALAS) (Cox *et al.*, 1991), en la aconitasa mitocondrial de mamíferos (mt-aco) (Gray *et al.*, 1996) y en la subunidad  $\beta$  de la succinato deshidrogenasa de *Drosophila melanogaster* (Kohler *et al.*, 1995). También se han identificado cinco estructuras IREs en el 3'UTR de Tfr (Kohler *et al.*, 1995). Aunado a estos hallazgos se han identificado dos proteínas conocidas como IRP1 e IRP2 (iron regulatory protein) con capacidad de unión a los IREs. Las IRPs tienen una función importante en la regulación del hierro intracelular, se unen con igual afinidad al IRE del mRNA de ferritina regulando su traducción, como al IRE mRNA de Tfr, regulando su estabilidad (Henderson *et al.*, 1996).

La IRP1 es una proteína bifuncional, con un núcleo 4Fe-4S. Cuando se encuentra como aconitasa citosólica cataliza la isomerización del citrato a isocitrato y en esta condición, no puede unirse a los IREs. Cuando los niveles de hierro intracelulares son bajos, el complejo 4Fe-4S se disocia y la proteína se une con gran afinidad al IRE, reprimiendo la expresión de la ferritina, ya que previene la unión de factores iniciadores de la traducción al sitio 5' cap del mRNA. Esto simultáneamente induce la síntesis de Tfr por protección/estabilidad de su mRNA a ribonucleasas (Addes *et al.*, 1998) (Figura 1).

Los estudios filogenéticos de las secuencias IREs han mostrado un consenso mínimo de 28 nucleótidos, formando dos regiones separadas por una pequeña burbuja de citosina localizada a cinco pares de bases antes de la burbuja conformada por seis nucleótidos (Barton *et al.*, 1990). Todos los IREs presentan en la burbuja una secuencia 5'-CAGUGN-3' donde la posición N puede ser A, C, U, pero no G, como se muestra en la Figura 2. Es importante resaltar la secuencia del tallo inferior del IRE, la cual no influye en la unión de las proteínas (Address *et al.*, 1997). El tallo superior requiere de una distancia correcta y una orientación espacial entre la burbuja C y la burbuja superior (Figura 2).

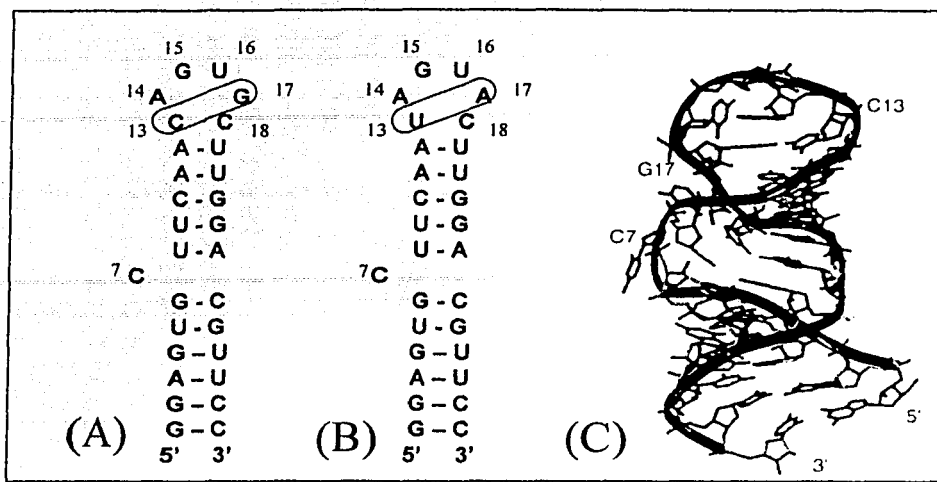
Por ensayos de entrecruzamiento con luz ultravioleta (X-UV) se ha demostrado que la IRP1 se une a cuatro nucleótidos del IRE. La unión de estas proteínas se ha localizado

entre la posición 13 y 17 de la burbuja conformada por seis nucleótidos en la estructura del IRE (Figura 2).



**Figura 1. Metabolismo celular del hierro en mamíferos.** Efecto del hierro en la expresión de ferritina y del receptor de la transferrina en la célula. En el extremo izquierdo de la figura se resume el efecto de niveles altos de hierro intracelular. En el extremo derecho se describe la participación de los IRPs para la toma de hierro extracelular.

Se ha identificado que el tipo de apareamiento entre estos nucleótidos de la burbuja son críticos para la eficiencia de unión de estas proteínas (Henderson *et al.*, 1996). Las IRPs pueden ser moduladas por diferentes factores, como la presencia de óxido nítrico NO (Phillips *et al.*, 1996), estrés oxidativo como el  $H_2O_2$  (Pantopoulos *et al.*, 1998), hipoxia (Hanson *et al.*, 1998), eritropoyetina (Weiss *et al.*, 1997),  $\alpha$ -anti-tripsina hepática (Graziadei *et al.*, 1997), fosforilación por proteínas cinasa C (PKC) (Schalinske *et al.*, 1996), hormona tiroidea (T3) (Leedman *et al.*, 1996) y grupo hemo (Goessling *et al.*, 1998).



**Figura 2. Secuencia y estructura secundaria de los IREs.** A) IRE de la ferritina humana cadena H. B) IRE de una mutante ensayada por Address (1997), donde la unión de la proteína no se modifica. C) Estructura tridimensional del IRE de la secuencia en A. C7 forma una pequeña burbuja; C13 y G17 se aparean. Figuras tomadas de Addees *et al.* (1997).

## 1.2. mRNAs con elementos ricos en AU, señal de degradación.

La regulación de la estabilidad y el tiempo de vida media de los mRNAs ha sido un tema importante en el estudio del RNA. Los análisis de la secuencia de los mensajeros con diferente estabilidad o tiempo de vida media en el citoplasma de células de mamíferos detectaron secuencias consenso en las regiones 3'UTR, principalmente pentanucleótidos AUUUA, hexanucleótidos AUUUUA (Tholanikunnel *et al.*, 1999), heptanucleótidos AUUUUUA (Balmer *et al.*, 2002) y nonanucleótidos UUAUUUA(U/A)(U/A) (Subyaga *et al.*, 1995; Lagnado *et al.*, 1994). Estas secuencias son conocidas como elementos ricos en A U (AU rich elements: AREs). Los AREs se han encontrado en mensajeros localizados tanto en el núcleo como en el citoplasma de las células de mamíferos y las levadura (Chen *et al.*, 2001). Los mensajeros que presentan este tipo de elementos en las células de mamíferos codifican proteínas que regulan la proliferación y diferenciación celular, así como la respuesta inflamatoria y la respuesta a estímulos ambientales (Suda *et al.*, 2002), tales como citocinas, oncoproteínas y receptores acoplados a proteína G (Mukherjee *et al.*, 2002). Existen evidencias de que mensajeros con AREs entran en un proceso muy dinámico de



des-adenilación y degradación del mensajero en el sentido 3' a 5'. En estudios *in vitro*, donde se han mutado los AREs en estos mensajeros, se ha encontrado un aumento en la estabilidad de los mismos (Mukherjee *et al.*, 2002), por lo que se ha propuesto que estas secuencias son determinantes de la estabilidad de los mensajeros.

Los AREs interactúan con proteínas de unión a RNA formando un complejo ribonucleoproteico (RNPs) (elementos *trans*) (Suda *et al.*, 2002). Una de estas proteínas es la AUF1 o ribonucleoproteína D (AUF1/hnRNP-D). En diferentes estudios se ha tratado de caracterizar la función de esta proteína, encontrándose que la unión a los AREs desestabiliza el mensajero (Buzby *et al.*, 1999). Por otro lado, se ha encontrado que la proteína HuR parece participar con una función antagónica a la AUF1, incrementando la estabilidad de mensajeros. Por tanto la pérdida de esta proteína está asociada con una expresión reducida de genes durante la replicación en envejecimiento celular (Wang *et al.*, 2001; Blaxall *et al.*, 2002).

Otras proteínas de unión a estos elementos además de la AUF1 y HuR son: hnRNP A1, TTP y hsp70 (Blaxall *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 1995). El que varias proteínas tengan la capacidad de unirse a los AREs, hace suponer que podrían estar compitiendo por un mismo sitio en el ARE de un mensajero específico. Por otro lado, estos y otros hallazgos sugieren que las RNPs pueden tener una participación multifuncional, que podría incluir estabilidad de mRNAs, modulación de la des-adenilación de mensajeros (Mukherjee *et al.*, 2002), participación en la vía de ubiquitinación/proteosoma y en el degradación de mRNA, así la capacidad de unirse a DNA para modular la función de las telomerasas (Blaxall *et al.*, 2002). Tan importante es la participación de estas proteínas en esta serie de eventos, que es conveniente mencionar que su unión puede estar fuertemente regulada por procesos de fosforilación, localización de componentes en el microambiente (concentración de mensajeros y/o RNPs en la zona), así como por la presencia de proteínas que no interactúan directamente con los AREs y que se comportan como proteínas co-asociadas o co-reguladoras de estas RNPs, las cuales responden a diferentes condiciones ambientales como estrés o presencia de sustratos específicos (Blaxall *et al.*, 2002; Vasudevan *et al.*, 2001).

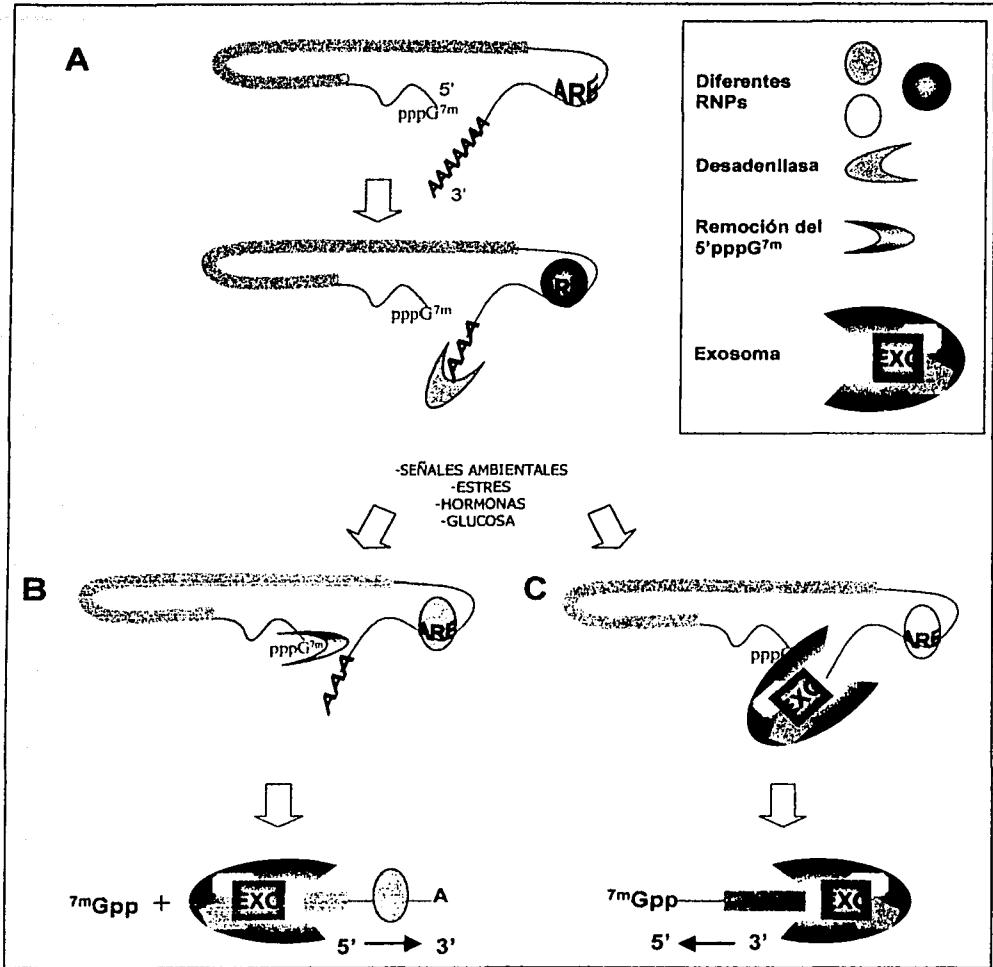
### 1.3. Vías de degradación de mRNAs en mamíferos y levadura.

En la mecanismo de degradación de mensajeros participa un complejo multiproteico llamado exosoma. En las células humanas y en levadura, este complejo se ha encontrado en el núcleo, participando en el procesamiento del RNA ribosomal (rRNA) y maduración de RNA pequeño nuclear (snRNA), y en el citoplasma, participando en la degradación de los mRNAs. Esto da evidencia de lo importante que es este complejo en los dos compartimentos (Mukherjee *et al.*, 2002). El exosoma de mamífero se ha purificado y caracterizado por espectrometría de masas. Su composición es muy similar al exosoma de la levadura (Chen *et al.*, 2001), el cual a su vez es similar al degradosoma de *Escherichia coli* por la presencia de RNAsa PH, RNAsa D o RNAsa R, RNA helicasas y RNAsa III (Mitchell *et al.*, 2000).

Para la degradación de los mensajeros en las levaduras se han descrito dos vías. En ambas, como primer paso, se encuentra el acortamiento de la cola de poli-A en el extremo 3' del mensajero. En la vía que no depende del exosoma el mensajero se degrada con dirección 5' a 3' comenzando con la remoción del cap 5' por la enzima Dcpip (decapping enzyme). Esta actividad está regulada por el tipo de cap, del propio mensajero, así como por el grado de poli-adenilación y los elementos AREs presentes en el mensajero (Chen *et al.*, 2001; Gao *et al.*, 2001; LaGrandeur *et al.*, 1998). La segunda vía de degradación no depende de la remoción del cap y sigue un patrón de actividad exonucleasa 3' a 5' dependiente del exosoma, posterior a la pérdida del extremo de poli-A (Dehilin *et al.*, 2000; Mukherjee *et al.*, 2002).

El proceso de degradación de los mensajeros en los mamíferos parece iniciarse también con la pérdida de residuos de adenina de la cola de poli-A ubicada en el extremo 3' del mensajero. Sin embargo, los pasos subsecuentes no están muy bien definidos, aunque se sugiere que la degradación puede ocurrir por ambas vías: 5' a 3' o 3' a 5', con una posterior degradación del resto del mensajero (Chen *et al.*, 2001). La presencia de AREs en los mensajeros promueve la participación del exosoma en la degradación vía 3' a 5'. Sin embargo, no se conoce el mecanismo por el cual el exosoma es capaz de distinguir substratos específicos (Mukherjee *et al.*, 2002). Se cree que las RNPs participan unidos a los AREs reclutan a este complejo y determinan el sustrato a degradar. En la Figura 3 se

presenta un modelo en el cual se compila la información de diferentes artículos con respecto a la degradación de mRNAs (Mukherjee *et al.*, 2002; Hoff *et al.*, 2002).



**Figura 3. Modelo de degradación de mensajero.** A) RNP con capacidad de reconocer elementos AREs y promover la pérdida de adeninas en el extremo 3' del mismo (mostrada con flecha gris). De acuerdo con factores ambientales como estrés, condiciones nutricionales, etc., el mecanismo de degradación puede ocurrir como en B o como en C. **B)** Degradación con dirección 5' a 3'. No se descarta la posibilidad de la interacción física con otras RNPs, como factores implicados en la remoción del Cap. **C)** RNPs pueden reclutar al exosoma promoviendo el degradación del mensajero en dirección 3' a 5' o proporcionarle estabilidad aumentando el tiempo de vida media del mensajero.

Por último, se ha descrito que la presencia de mutaciones en los AREs de diferentes mensajeros pueden ser de las causas etiológica de enfermedades malignas como linfoma y neuroblastoma (Suda *et al.*, 2002).

#### 1.4. Factores que determinan inestabilidad en mRNAs citoplásmicos de plantas.

La estabilidad de los mRNAs de plantas ha sido menos estudiada que el mecanismo de transcripción *per sé*. Sin embargo, se han encontrado mensajeros de vida media corta (horas o minutos), en los cuales se ha determinado la participación de factores en *cis* formando complejos con RNPs. Estas proteínas participan en mecanismos de síntesis, procesamiento, edición, modificación y exportación de RNAs (Proudfoot *et al.*, 2002; Reed *et al.*, 2002; Klock *et al.*, 2002), así como en el desarrollo floral correcto y mediando señales hormonales y ritmo circadiano (Fedoroff, 2002).

El estudio de los factores en *cis*, se encuentran elementos que generan estabilidad del mensajero. Dentro de los factores en *cis* se encuentra en el 5' del mensajero el cap (cinco metil-guanosina) y en el 3' una secuencia de poli-A. Los factores en *trans* que interactúan con estas últimas secuencias son proteínas de unión a la cola de poli-A (poly-A binding proteins: PABPs), las cuales presentan cuatro dominios de unión a RNA y son muy conservadas evolutivamente. No se conocen con detalle los mecanismos responsables de la remoción de estos extremos o la regulación de la estabilidad específica de ciertos mensajeros.

En los genes SAUR (small Auxin-Up RNA) en soya y *Arabidopsis* se han encontrado otro tipo de elementos en *cis* (McClure *et al.*, 1989). Estos transcritos presentan tiempos de vida media de 10 a 50 min. El gen más estudiado es el SAUR-AC1 de *Arabidopsis* (Gil *et al.*, 1994): Este gen fue analizado desde su región promotora, secuencia codificadora y regiones no traducibles, determinando que existen elementos característicos en la región 3'UTRs de todos los transcritos SAUR que confieren inestabilidad a los mensajeros que los poseen. Estas regiones se denominaron elementos río abajo (downstream elements: DST). Estos elementos consisten de tres subdominios conservados, separados por dos regiones variables en secuencia y cantidad de nucleótidos (Figura 4).



**Figura 4. Secuencia consenso del elemento DST identificado en algunos mRNAs muy inestables en plantas.** Los números romanos indican los tres subdominios que caracterizan a este elemento. Las letras mayúsculas son los nucleótidos conservados y las letras minúsculas indican nucleótidos mas frecuentes. N ( ) indica el número de nucleótidos que separa a un subdominio del siguiente.

Otro ejemplo de regulación postranscripcional se presenta en una respuesta a la infección por hongos. El daño producido por infección o por heridas en las plantas desencadena una serie de mecanismos de defensa que comienza por el reforzamiento de las paredes celulares. Algunas de las proteínas encontradas en la pared celular sin estrés, son ricas en prolina, como la PvPRP1 (cell wall proline-rich protein). Por tanto, esta proteína se degrada en los casos de estrés, como parte de un mecanismo de conservación de energía metabólica. Por otro lado, se inicia la transcripción de proteínas ricas en tirosina, que refuerzan la pared celular. Se ha encontrado que el mRNA de PvPRP1 presenta una secuencia de aproximadamente 27 nt en la región 3'UTR, que determina la estabilidad del mensajero. Esta secuencia presenta una región rica en U con un motivo de AUUUA (Abler *et al.*, 1996). En donde se une una proteína de 50 kDa, esta proteína fue llamada PRP-BP y muestra gran afinidad por el RNA en extractos tratados con moléculas "elicitador" de *Colletotrichum lindemuthianum* y su unión a RNA es regulada por el estado redox, en ensayos *in vitro* (Lamb *et al.*, 1997; Medi *et al.*, 1998).

## 2. CONTROL DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA EN EL CLOROPLASTO

La expresión genética en los cloroplastos está regulada a diferentes niveles, dentro de los cuales se encuentran la transcripción y la maduración de los mRNAs. En los eventos de maduración de los mensajeros existe splicing, edición y procesamiento de los extremos 5' UTR y 3'UTR, tanto de mensajeros mono- como policistrónicos. Además, también existen los mecanismos de estabilidad y degradación de los mensajeros, los cuales también son importantes en la regulación genética.

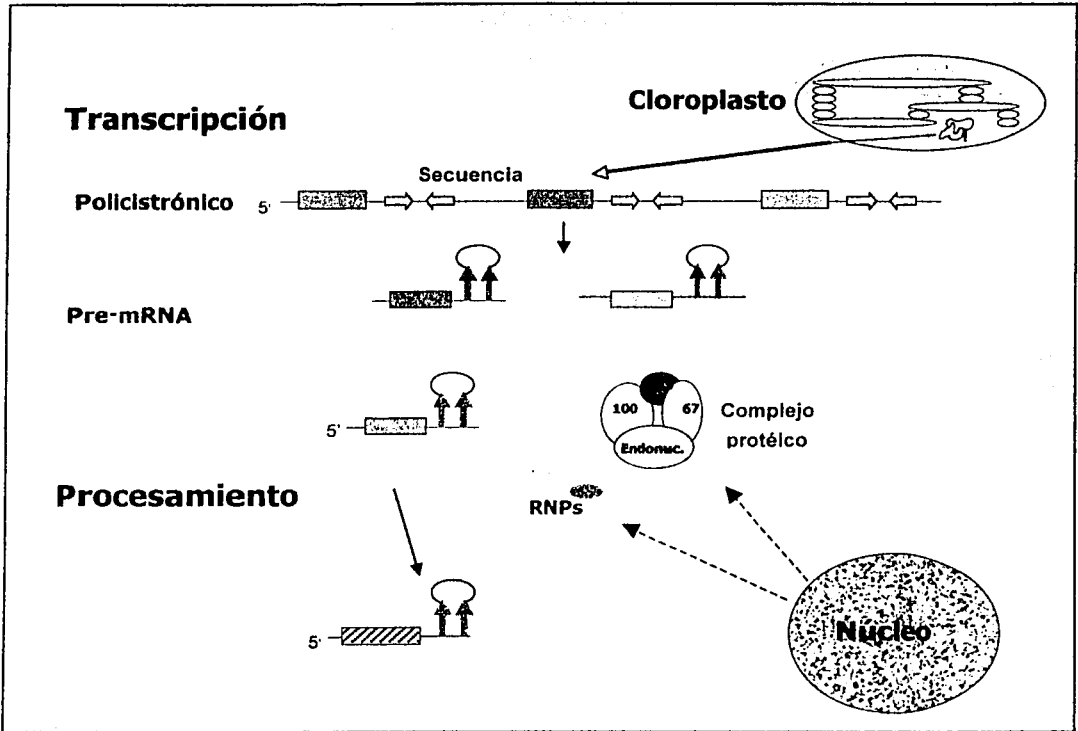
Los cloroplastos son organelos que contienen un genoma circular, el cual codifica aproximadamente para 100 proteínas. Para el funcionamiento de este organelo es necesaria la participación de proteínas que son codificadas en el núcleo, traducidas en el citoplasma y posteriormente transportadas al cloroplasto (Sugiura, 1989). Algunas de las proteínas codificadas en el núcleo, con actividad en el cloroplasto, están los factores de transcripción, proteínas de división para cloroplasto, proteínas de unión a RNA y proteínas que integran los fotosistemas, entre otras (Fujiwara *et al.*, 2001). Sin embargo, el genoma cloroplástico es autosuficiente en el proceso de traducción, ya que contiene todos los tRNAs, rRNAs y proteínas ribosomales necesarios.

La mayoría de los genes cloroplásticos se transcriben de manera policistrónica. Algunos policistrones codifican proteínas de un cierto proceso bioquímico, aunque frecuentemente se encuentran policistrones con genes cuyos productos no tienen funciones relacionadas. Los dos tipos de policistrones son procesados para producir unidades independientes, por una serie de pasos controlados y con la participación de factores nucleares (Figura 5) (Mullet, 1993). Estos eventos están sujetos a regulación diferencial llevada a cabo por la maquinaria de procesamiento post-transcripcional (Del Campo *et al.*, 2002).

## 2.1. Control de la expresión genética a nivel transcripcional.

Un claro ejemplo de regulación a nivel transcripcional se ha observado en mutantes fotosintéticas de *Chlamydomonas reinhardtii*, en donde se han encontrado un gran número de productos nucleares involucrados en los procesos de transcripción, así como de procesamiento, traducción y estabilidad de mensajeros cloroplásticos (Rochaix, 2001). Se han identificado dos tipos de factores nucleares que participan en la transcripción: el primer tipo son los factores que se unen al DNA en presencia de la RNA polimerasa. En cloroplastos y etioplastos se han encontrado factores tipo sigma que responden a la luz y que pueden modular la actividad transcripcional por mecanismos de fosforilación y defosforilación (Tiller *et al.*, 1993). El segundo tipo son proteínas secuencia específica que participan como activadores o represores transcripcionales. Como ejemplo de este tipo de factores se ha identificado, en la región promotora del gen *psbD*, un elemento que puede

ser reconocido por CDF2 (chloroplast DNA binding factor 2), que modula la expresión de este gen fotosintético (Iratni *et al.*, 1994).



**Figura 5. Modelo de control de la expresión genética en cloroplastos.** En este esquema se muestra la participación de factores nucleares en el procesamiento de mensajeros cloroplásticos (ver explicación en el texto).

## 2.2. Control de la expresión genética a nivel postranscripcional.

Durante la diferenciación de los proplastidios a cloroplastos, los niveles de transcritos se incrementan debido a la activación de genes fotosintéticos (Taylor, 1989). En estudios comparativos de las actividades de transcripción y acumulación de mensajeros fotosintéticos como *psbA* (proteína D1 del fotosistema II), *rbcL* (subunidad grande de la ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa) y *atpB/E* (subunidades  $\beta$  y  $\epsilon$  de la ATP sintasa) de plástidos de espinaca y cebada, se observó un incremento diferencial de estos mensajeros,

el cual no puede ser explicado por un aumento en la transcripción (ya sea por niveles altos de algunas de las RNA polimerasas presentes o la accesibilidad y fuerza de los promotores *per sé*). Este incremento diferencial se debe a un aumento en el tiempo de vida media de los mensajeros, generando la acumulación de los mismos (Mullet *et al.*, 1987; Gruijssem *et al.*, 1988). Estos resultados mostraron la independencia que existe entre la actividad transcripcional y la acumulación de transcritos durante el desarrollo de los plastidios, sugiriendo la existencia de mecanismos que pueden modular la estabilidad de los mensajeros.

Uno de los factores que participa en la acumulación y estabilidad de los mensajeros es la presencia de estructuras secundarias en el extremo 3'UTR y de estructuras secundarias y terciarias presentes en otras regiones de los mensajeros. Estos elementos pueden interactuar con factores que actúan *in trans* como las RNPs y en otros casos por interacción con otros RNAs (Klaff *et al.*, 1996). Un dato interesante es que, a pesar del origen endosimbiótico de los cloroplastos, el promedio de vida media de los mensajeros de procariotes está dado en segundos, mientras que en cloroplastos es de horas, aunque existen diferencias en genes específicos. Por ejemplo, el mensajero de *psaA* (apoproteína clorofila  $\alpha$  del fotosistema I) tiene una vida media de 6 h, mientras que el mensajero de *psbA* presenta una vida media de 40 h (Kim *et al.*, 1993; Klaff *et al.*, 1991). Sugiriendo que existen mecanismos específicos de estos organelos que permiten esta diferencia.

Otro ejemplo de regulación postranscripcional se presenta en el operón *ndhH-D*. Este operón contiene seis genes *ndh*, cuyos productos se encuentran en bajos niveles en el cloroplasto y el gen *psaC* (proteína PsaC del fotosistema I) cuyo producto es muy abundante. Específicamente, *psaC* se encuentra antes del gen *ndhD*, por lo que el 3'UTR de *psaC* es también el 5'UTR del *ndhD*. En esta región se llevan a cabo procesos de edición en dos sitios diferentes, por lo que el procesamiento de *psaC* genera un mensajero *ndhD* no funcional. Si se procesa correctamente el 5'UTR de *ndhD*, entonces el mensajero de *psaC* es inestable. Para el gen *ndhD*, el sitio II cercano al sitio de inicio de la traducción, siempre es editado. La edición del sitio I parece ser importante para producir un RNAm funcional de *psaC*, lo que es observado con mayor frecuencia. Se desconocen los factores que participan en el "switching" de este procesamiento (Del Campo *et al.*, 2002).



### 2.3. Procesamiento de los extremos 3'UTRs de mRNAs de cloroplasto.

El procesamiento de mRNA es un evento que ocurre en múltiples pasos y cuyo resultado es un mensajero funcional con una estabilidad y localización subcelular apropiada para su traducción. Uno de los aspectos importantes es la secuencia y estructura secundaria del RNA. En los extremos 3' UTRs de transcritos mono y policistrónicos se han encontrado secuencias repetidas e invertidas (IR), las cuales pueden formar estructuras estables de tallo-asa (Stern *et al.*, 1987). Estas estructuras son similares a las presentes en genes de procariotes, en los cuales funcionan como terminadores de la transcripción independientes de rho. En cloroplastos se ha demostrado que estas secuencias IR funcionan como elementos regulatorios en *cis*, que son utilizados como guías para el procesamiento y la estabilidad del mensajero tanto *in vitro* como *in vivo* (Stern *et al.*, 1989; Stern *et al.*, 1991; Monde *et al.*, 2000).

El procesamiento del extremo 3'UTR ha sido estudiado en cloroplastos de espinaca y *Chlamydomonas reinhardtii* a partir del aislamiento de un complejo proteico soluble de cloroplasto, con capacidad de procesar los 3'UTRs (Stern *et al.*, 1993; Hayes *et al.*, 1996). Estos estudios han mostrado el probable mecanismo de procesamiento, se lleva a cabo en dos pasos. En el primer paso hay un corte endonucleolítico entre 10 y 20 nt después de la estructura tallo-asa. En espinaca se encontró una proteína de 67 kDa que presenta inmunoreactividad con la RNAasa E de *E. coli* y posteriormente se identificó como GroEL. La actividad endonucleolítica de GroEL no ha quedado clara (Baginsky *et al.*, 2002). Sin embargo, se ha revelado la presencia de otras endonucleasas como la CSP41 (Yang *et al.*, 1996). Este corte endonucleolítico es seguido por una degradación 3'→5' que continúa hasta uno o dos nucleótidos antes del tallo-asa (Hayes *et al.*, 1996). La exonucleasa, responsable de esta actividad, ha sido identificada en espinaca como una proteína de 100 kDa, la cual presenta homología con la PNPasa de *E. coli* (Monde *et al.*, 2000; Schuster *et al.*, 1999). Esto se esquematiza en la Figura 6.

### 2.4. Regulación de la traducción.

La mayoría de los procesos realizados en cloroplastos son regulados por la luz. En el caso de la regulación de la expresión genética, se ha demostrado la participación de la luz como agente inductor o represor, tanto a nivel postranscripcional como traduccional. Las

RNPs participan en estos procesos dependiendo de señales externas como cambios en la fosforilación y niveles de oxido-reducción. En los cloroplastos de *C. reinhardtii* se aislaron un complejo de varias proteínas que se unen específicamente al 5'UTR de *psbA*.

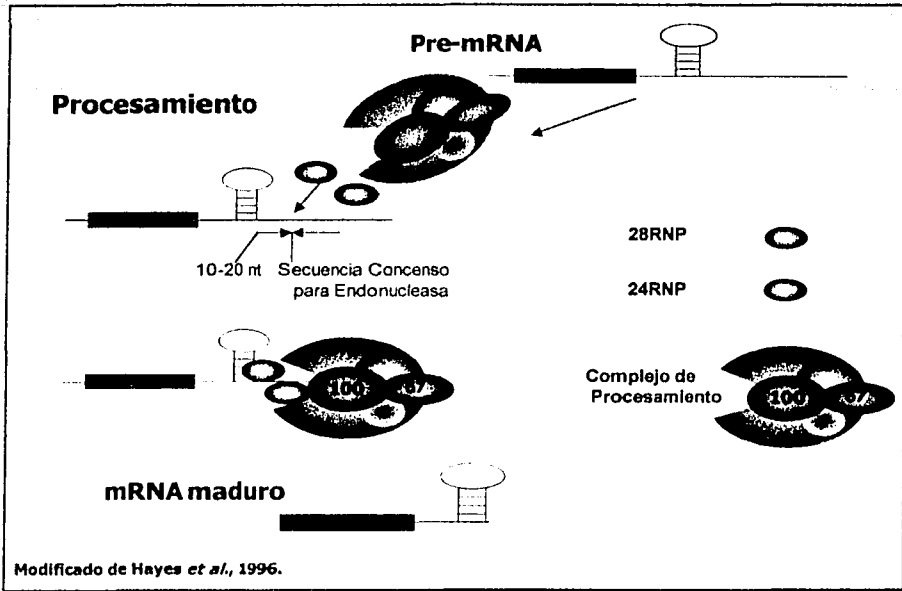
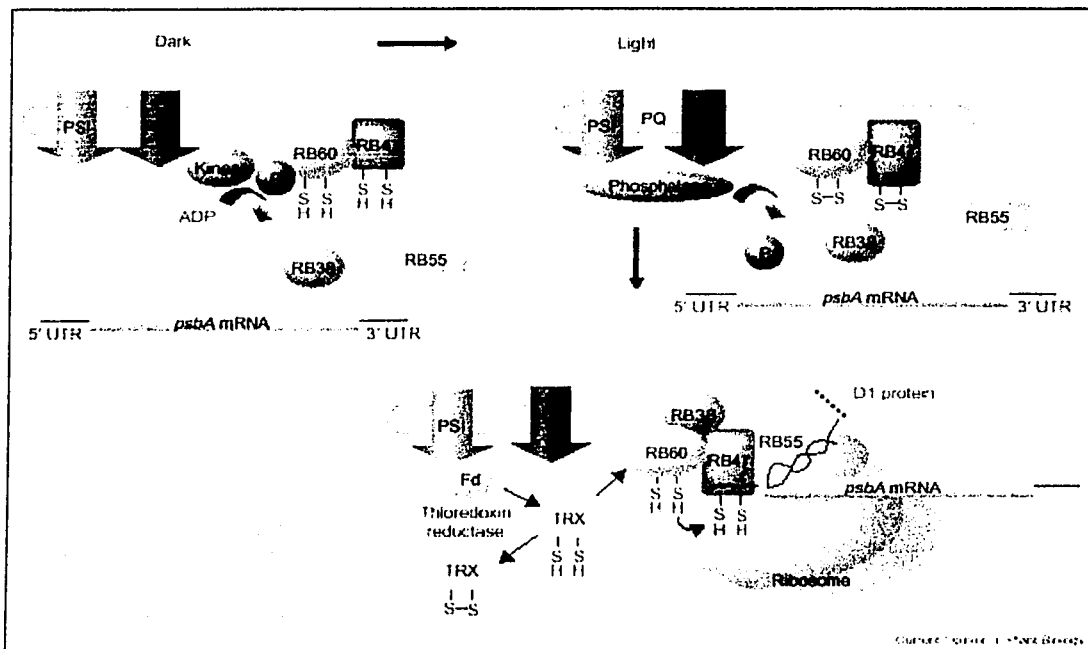


Figura 6. Modelo de procesamientos de los 3' UTRs de cloroplastos. En este esquema se muestra el mecanismo de procesamiento de mensajeros de cloroplasto (ver explicación en el texto).

Las proteínas identificadas son RB38, RB47, RB55 y RB60-63. RB47 interactúa específicamente con la región 5'UTR de este mRNA y todas se requieren para la traducción. La Figura 7 muestra la participación de las RNPs en procesos de regulación fina de los niveles de expresión de proteínas debido por la presencia de luz. En diversos estudios se ha propuesto que la estabilidad del mRNA de *psbA* se basa en la capacidad de formación de este complejo RNA-proteína, el cual puede asociarse a los ribosomas. RBP47 es un miembro de la familia de las PABPs y está asociada a las membranas de los tilacoides, estimulando la traducción (Ion *et al.*, 1998), la presencia de proteínas de tipo PABPs en el cloroplasto no es común, puesto que los mensajeros no se poli-adenilan para una eficiente traducción, como ocurre en los mensajeros citoplásmicos. RBP63, la cual se ubica en la

cara del estroma en la membrana del tilacoide, preferentemente se une a la región rica en adeninas (7-8 As) localizada entre 8-14 nucleótidos antes del codón de inicio. Por evidencias mostradas a partir de mutantes de esta proteína, se ha sugerido que la RBP63 participa en la traducción del mensajero más que en la estabilidad del mismo (Ossenbühl *et al.*, 2002).



A diagrammatic representation of molecular interactions in the light-regulated translation of *psbA* mRNA in thylakoids. Fd, ferredoxin; PQ, plastoquinone; PSII, photosystem I and II; TRX, thioredoxin.

**Figura 7. Modelo propuesto de la participación de RNPs en la regulación de la traducción.** Este esquema fue tomado de Fedoroff, 2002.

A partir de los estudios realizados con RNPs encontradas en los cloroplastos se ha propuesto la existencia de dos clases de RNPs: la primera se une al RNA sin restricción de estructuras y/o secuencias específicas y la segunda interactúa con especificidad a ciertas estructuras y/o secuencias de los mensajeros (Stern *et al.*, 1989b). Un ejemplo de este segundo grupo es el de las RNPs que se unen a los 5'UTRs de los mensajeros que codifican las diferentes subunidades de la ATP sintasa. Los RNAs de estas subunidades se encuentran localizados en diferentes operones (*atpA*, *atpB/E*, *atpF*, *atpH* e I), lo que sugiere que las

RNPs participan en un proceso de regulación general de los mRNAs con función relacionada (Robida *et al.*, 2002).

## 2.5. RNPs que interactúan con los 3'UTRs de cloroplastos de espinaca.

Se han identificado un gran número de proteínas con capacidad de unión a los 3'UTRs de cloroplastos de espinaca. Desde 1989, el grupo de Grusisem describió la función de las secuencias IR en los 3' UTRs de mensajeros cloroplásticos, así como las proteínas que interactúan con estas secuencias. En estos trabajos se estudiaron las proteínas de unión a RNA por técnicas de entrecruzamiento con luz ultravioleta (X-UV) (Stern *et al.*, 1989b). Las proteínas que se encontraron, tuvieron masas moleculares entre 24 a 100 kDa (Stern *et al.*, 1989a; Hsu-Ching *et al.*, 1991). Estas forman parte de un complejo proteico de alto peso molecular, de aproximadamente 500 kDa, con capacidad de procesamiento de extremos 3'UTRs. Este complejo se purificó de cloroplastos intactos de espinaca, utilizando cromatografías de intercambio aniónico, ssDNA-celulosa y una cromatografía de afinidad con RNA (Hayes *et al.*, 1996). Las proteínas identificadas y su función se resumen en la Tabla 1.

**Tabla 1. Proteínas presentes en el complejo de procesamiento-degradación de los 3'UTRs de cloroplastos de espinaca.**

Peso Molecular	Nombre	Función	
100 kDa	100RNP	Exorribonucleasa 3' → 5', poliA polimerasa	Hayes <i>et al.</i> , 1996 Yehudai <i>et al.</i> , 2001
67 kDa	GroEL	Función desconocida	Baginsky <i>et al.</i> , 2002
55 kDa	55RNP o CSP55	RNP, reconoce motivos ricos en A-U, probablemente previene el corte de p67; Endorribonucleasa	Hsu-Ching <i>et al.</i> , 1991a
41 kDa	CSP41	Endorribonucleasa	Yang <i>et al.</i> , 1996 Bollenbach <i>et al.</i> , 2003
33 kDa	33RNP	RNP, unión al tallo-asa específicamente	Hsu-Ching <i>et al.</i> , 1991b
28 kDa	28RNP	RNP, dirigir el procesamiento del extremo 3'UTR	Lisitsky <i>et al.</i> , 1995
24 kDa	24RNP	RNP, Posiblemente estabilizando algunos mensajes	Loza-Tavera <i>et al.</i> , (en preparación)

TESIS CON  
FALLA DE QUIENEN

La comparación de secuencias de la 28 y 24RNP muestran una identidad de 57%. Estas proteínas presentan un dominio ácido en el extremo amino terminal, en donde sólo hay 15% de identidad. Además, presentan dos RBDs, los cuales son altamente conservados con respecto a otras especies. Cada uno de los dominios de unión a RNA está formado por aproximadamente 80 residuos, los cuales presentan dos secuencias consenso, RNP1: GFGFVTM y RNP2: LFVGNL (Varani *et al.*, 1998). La estructura de estos dominios es altamente conservada. Por estudios de resonancia magnética nuclear en proteínas de este tipo de mamíferos, plantas y hongos se ha encontrado una estructura compacta  $\beta 1-\alpha 1-\beta 2-\beta 3-\alpha 2-\beta 4$  (Dreyfuss *et al.*, 1993; Cusack, 1999).

La 28RNP fue la primera proteína purificada de este complejo, cuya función es la de dirigir el procesamiento de los extremos 3'UTRs en la zona correcta de maduración. La unión está caracterizada por reconocer motivos estructurales, más que una secuencia específica (Schuster *et al.*, 1991). Sin embargo, en estudios de unión, presenta mayor afinidad por secuencias poli G y poli U. Ensayos de unión con la 28RNP recombinante obtenida de *E. coli* mostraron que la presencia de dos G son suficientes para promover su unión con el RNA (Lisitsky *et al.*, 1995a). Esta proteína pueden ser fosforilada post-traduccionalmente mostrando menor afinidad por el RNA en su estado fosforilado (Lisitsky *et al.*, 1995c).

El gen que codifica la 24RNP se aisló en el laboratorio del Dr. W. Gruissem, en la Universidad de California, en Berkeley. Su secuencia está disponible en el Gene Bank con número de acceso U34742. La masa molecular de la proteína madura es de 24,205.61 Da. Esta proteína también puede fosforilarse, aunque en este caso, la proteína fosforilada presenta mayor afinidad por los extremos 3'UTRs de los mensajeros *petD* y *psbA* de espinaca (Loza-Tavera *et al.*, manuscrito en preparación).

La concentración de la 24 y la 28RNPs, en extractos de procesamiento de RNA de cloroplastos de hojas de espinaca menores a 7 cm, es muy similar entre sí: 2.4 ng y 2.9 ng por  $\mu\text{g}$  de proteína total respectivamente (Hernández-Navarro, 2000). Las características similares entre la 24 y la 28RNP y los resultados obtenidos en experimentos de procesamiento de RNA *in vitro* realizados en el laboratorio, han sugerido que la 24RNP podría estar participando en la estabilización de los mensajeros, impidiendo la acción del complejo de degradación y/o ubicando al complejo de procesamiento en las regiones

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

adecuadas para la correcta maduración. Por lo anterior, en nuestra línea de investigación es importante caracterizar la unión de la 24RNP a los 3'UTRs de cloroplasto de espinaca.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# HIPOTESIS

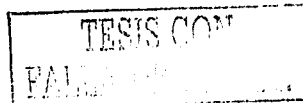
Dado que la proteína 24RNP participa en eventos de procesamiento de mensajeros cloroplásticos *in vitro*, proponemos que esta proteína se unirá de forma diferencial a lo largo de los extremos 3'UTR de *petD* y *psbA* de cloroplastos de espinaca.

## OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la unión de la 24RNP a los extremos 3' UTRs de los mensajeros de *psbA* y *petD* codificados en el cloroplasto de espinaca.

## OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la participación de la estructura secundaria en la unión de la 24RNP a los 3'UTRs de *psbA* y *petD*.
2. Seccionar los extremos 3'UTRs para utilizarlos en los ensayos de unión con la 24RNP.
3. Caracterizar la unión de la 24RNP a los diferentes segmentos de los 3'UTRs, utilizando las técnicas de entrecruzamiento con luz ultravioleta (X-UV) y geles de retardo.
4. Analizar matemáticamente los mecanismos de unión de la 24RNP a los 3'UTRs.
5. Proponer un modelo de unión de esta proteína a los 3'UTRs.



## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

A) Para la caracterización de la unión de la 24RNP a los 3'UTR, se produjo 24RNP recombinante y se clonó el extremo 3'UTR del gen *psbA* (codifica la subunidad D1 del fotosistema II) el cual se utilizó, junto con el 3'UTR de *petD* (codifica la subunidad IV del citocromo *b<sub>6</sub>/f*) (Sijben *et al.*, 1986), para los ensayos de unión.

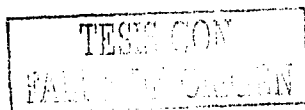
B) Para conocer la presencia de las posibles estructuras secundarias presentes en los RNAs utilizados, se realizó un análisis teórico del plegamiento de las secuencias de los dos 3'UTRs completos (sitio [www.bioinfo.rpi.edu/zukerm/rna/](http://www.bioinfo.rpi.edu/zukerm/rna/)).

C) Se realizó el análisis teórico de la estabilidad de las estructuras secundarias a diferentes temperaturas (en el sitio antes mencionado) Se determinó la temperatura a la cual se pierden las estructuras secundarias adyacentes al tallo-asa más estable. Esta información se utilizó para realizar ensayos de unión con RNAs desnaturalizados.

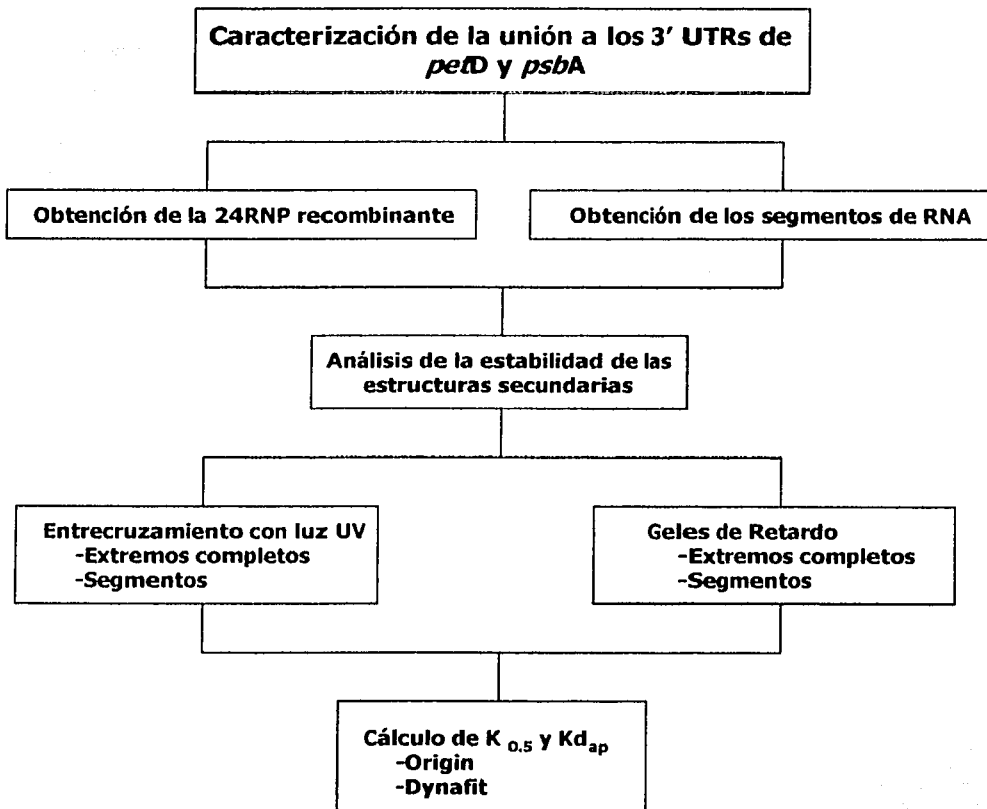
D) Para un análisis detallado de la unión de la 24RNP a los 3'UTRs, éstos extremos se seccionaron en 5 segmentos. El primer segmento " 5' " presenta la secuencia anterior a la estructura tallo-asa de mayor estabilidad. El segmento "T-A", presenta la secuencia de la estructura tallo-asa. El segmento " 3' " presenta la secuencia posterior al tallo-asa. El cuarto y quinto segmentos están compuestos por dos de los anteriormente descritos, esto es; 5' T-A y el T-A 3'. Para la síntesis de los moldes se emplearon reacciones de PCR y para la síntesis de los RNAs, transcripción *in vitro* con UT<sup>32</sup>P.

E) Los ensayos de unión para los extremos completos y los diferentes segmentos se realizaron por dos técnicas, entrecruzamiento con luz ultravioleta (X-UV) y geles de retardo.

F) El análisis de la unión se realizó utilizando el programa Origin 5.0 y el Dynafit, para los resultados de los ensayos de X-UV y geles de retardo, respectivamente. De este análisis se obtuvieron  $K_d$  aparentes, como parte de la caracterización.







# MATERIALES Y MÉTODOS

## 1. PREPARACIÓN DE LOS RNAs

### 1.1. Clonación del extremo 3'UTR del gen *psbA* de espinaca.

Se diseñaron iniciadores para utilizarlos en la amplificación por PCR del extremo 3'UTR del gen *psbA* de espinaca. La secuencia de los iniciadores se muestra en la tabla 2, en donde el iniciador PSBAF sentido (forward) contiene la secuencia de reconocimiento para la endonucleasa *Kpn* I en la región 5', mientras que el iniciador PSBAR antisentido (reverse), presenta la secuencia de reconocimiento para la endonucleasa *Bam* HI en la región 5'. La reacción de PCR se realizó utilizando DNA total como molde y el producto de PCR tiene un tamaño de 287 pb y contiene 96 pb de la secuencia codificante y 184 pb de la región 3'UTR.

Las condiciones para la amplificación fueron las siguientes: la reacción se realizó en un volumen final de 25  $\mu$ L;  $MgCl_2$  1.5 mM; mezcla de dCTP, dATP, dGTP, dTTP (Gibco BRL, EUA) 100 mM; iniciadores PSBAF Y PSBAR 25 pmoles por reacción; Taq DNA polimerasa 1 U (Invitrogen, EUA); buffer de la enzima 1X; DNA (10 ng/ $\mu$ L) 3.5  $\mu$ L. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (Omn-E thermal cycler, Labnet, Reino Unido). Empleando un ciclo de 94°C 5 minutos; 35 ciclos: 94°C 45 segundos; 50°C 45 segundos; 72°C 45 segundos y un ciclo de 72°C 10 minutos.

El producto de PCR y el plásmido pBluescript SK (+/-) (Stratagene, EUA) se digirieron con las enzimas *Kpn* I y *Bam* HI y se purificaron después de haber sido separados en un gel de agarosa. Para la purificación se utilizó el kit QIAEX II gel extraction (Qiagen, EUA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se efectuó la ligación utilizando T4 DNA ligasa (Gibco BRL, NY, EUA) procurando tener una relación de vector:inserto de 1:5. El volumen de reacción fue de 20  $\mu$ L y la ligación fue llevada a cabo a 36°C. El plásmido recombinante fue nombrado pBSpsbAS.

Células de *E. coli* XL-1 Blue se trataron para hacerlas competentes, empleando el método de cloruro de calcio. Estas células se transformaron con 10  $\mu$ L de la reacción de ligación. Se cultivaron en agar LB suplementado con ampicilina 100  $\mu$ g/mL. Las bacterias se incubaron toda la noche a 37°C. y de las colonias obtenidas se realizaron cultivos de 5

mL de medio LB suplementado con ampicilina. Posteriormente se extrajo el DNA plasmídico utilizando el kit QIAprep (Qiagen, EUA); la presencia del inserto en el plásmido recombinante se verificó por la doble digestión con *Kpn* *VBam* *Hl* y posteriormente se secuenció en el Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

### 1.2. Extremo 3'UTR del gen *petD* de espinaca.

El extremo 3'UTR del gen *petD* de espinaca se encontraba clonado entre los sitios *Kpn* I-*Xba* I del plásmido pIBI76 (International Biotechnologies Inc.), llamado p2\*. Esta construcción contiene un segmento de 78 pb de la región codificadora de *psbA* y 138 pb de la región 3'UTR. Este segmento de 216 pb se encuentra bajo el control del promotor de la RNA polimerasa T7. Para la transcripción *in vitro*, este plásmido fue linearizado con *Xba* I (Stern y Gruissem, 1987).

### 1.3. Síntesis de los moldes para transcribir los diferentes segmentos de los 3'UTRs.

Los moldes utilizados para la transcripción *in vitro* de los diferentes segmentos de los 3'UTRs, se sintetizaron por PCR. Todos los productos obtenidos presentan la secuencia promotora de la RNA polimerasa T7. Los plásmidos pBSpsbAS y p2\* se utilizaron como moldes para la obtención de los segmentos 5' y 5' tallo-asa (5' T-A) (Figura 8). Para generar los segmentos 5' de *psbA* y *petD* se utilizaron, como iniciador sentido FPT7, el cual presenta la secuencia promotora para la RNA polimerasa T7 y como iniciadore antisentido, RA y R1 para *psbA* y *petD*, respectivamente. Para obtener los segmentos 5' T-A de *psbA* y *petD*, se utilizó la combinación de FPT7 con RB y R2 respectivamente (Tabla 2, Figura 8).

Para obtener los segmentos tallo-asa (T-A), tallo-asa 3' (T-A 3') y 3' fue necesario realizar un PCR a partir de los plásmidos pBSpsbAS y p2\* sin la secuencia promotora T7, que originalmente contenían estos plásmidos. Para obtener el extremo de *psbA* se utilizaron los iniciadores PSBAF/PSBAR descritos anteriormente y para el extremo de *petD*, se utilizaron los iniciadores FNPd/F3. Estos productos se usaron como moldes para la generación del segmento T-A empleando los iniciadores FA/RB y F2/R2 para *psbA* y *petD* respectivamente. Para la obtención de los segmentos T-A 3' se utilizaron los iniciadores FA/PSBAR y F2/R3 para *psbA* y *petD* respectivamente. Finalmente para generar los

segmentos 3' se utilizaron los iniciadores FB/PSBAR y F3/R3 para *psbA* y *petD* respectivamente (Tabla 2, Figura 8).

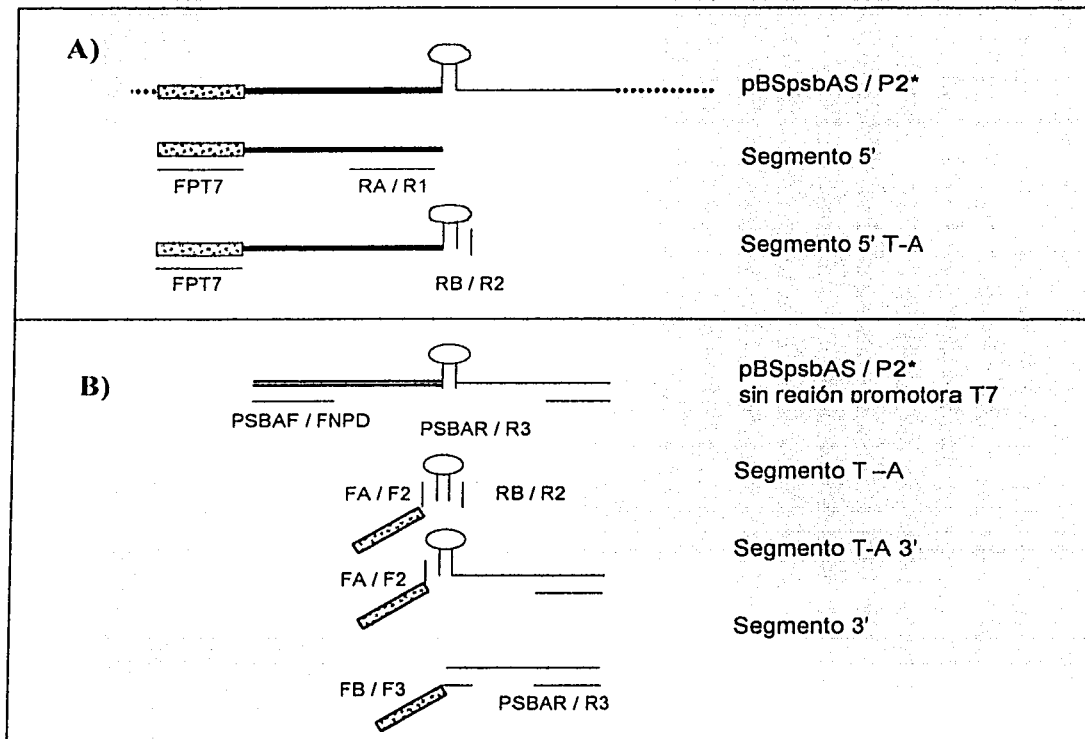
**Tabla 2. Secuencia de los iniciadores utilizados.**

Iniciador	Tm (°C)	Secuencia (5'- 3')
PSBAF	53	GGG GTA CCG TGC TAA CCT TGG
PSBAR	51	CGG GAT CCG GAT TCA CAA TCC
FPT7	61	<u>CGC GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG</u>
RA	61	TTC ACT AAC TCA TCT ACA CTA AGC TAA AAA TG
R1	61	CAC GCC GTG TTA TTT CAT AAT TG
RB	61	AGT AAA GGA GCA ATA ACC GAT TTC TT
R2	62	TGT ATC TAG GGA AAA TTC ACG TTG AAG
FNPD	59	CGT AGT GGC CCT GTG GTT AG
R3	59	TCT AGA AAA GCA TTT CGT AAT TGA TT
FA	51	<u>CGC GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG</u> AGT AAA GGG GCA GTG C
RB	61	AGT AAA GGA GCA ATA ACC GCT TTC TT
F2	57	<u>CGC GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG</u> TGT ATC TAG GGA ATA GTC ACT TCA AC
FB	51	<u>CGC GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG</u> AGT AAA GGG AGT ACT AGT TAT AAA TAG TTC AGT TA
F3	55	<u>CGC GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG</u> AGT AAA GGG CAT CTA TTC AAT TAC TTT TTT TCA TC

La secuencia subrayada corresponde al promotor de la RNA polimerasa T7.

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen final de 50 µL conteniendo: MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM; mezcla de dCTP, dATP, dGTP, dTTP (Gibco BRL, NY, EUA) 100 mM, iniciadores 25 pmoles por reacción, Taq DNA polimerasa 1 U, buffer de la enzima 1X, DNA molde 10 ng. La amplificación se realizó con el siguiente programa: un ciclo de 94°C, 5 minutos; 35 ciclos de a) 94°C, 45 segundos; b) las temperaturas de







“annealing” fueron de 50°C para los iniciadores con T<sub>m</sub> de 51-53°C, 56°C para los iniciadores con T<sub>m</sub> de 55-57°C y de 61°C para los iniciadores con T<sub>m</sub> de 59-62°C, durante 45 segundos y c) 72°C, 45 segundos, y un ciclo de 72°C durante 10 minutos. Posteriormente los productos de PCR se purificaron a partir de un gel de agarosa para utilizarlos en la transcripción *in vitro*.



**Figura 8. Amplificación de los diferentes segmentos de los extremos 3'UTRs.** Estrategia para la obtención de los diferentes productos de PCRs que fueron posteriormente utilizados como moldes para la transcripción *in vitro* de los segmentos 5' y 5' T-A. **A)** Síntesis de moldes para la transcripción *in vitro* de los segmentos 5' y 5' T-A. **B)** Síntesis de moldes para la transcripción *in vitro* de los segmentos T-A, T-A 3' y 3'. [Shaded box] Región promotora de T7. Las abreviaturas para los iniciadores están definidas en la Tabla 2.

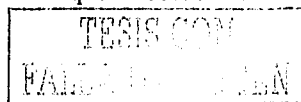
La cantidad de nucleótidos (nt), tamaños (kDa) y cantidad de Uracilos (U<sub>T</sub>) por segmentos de los transcritos sintetizados, tanto de *petD* como de *psbA* se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Características de los RNAs sintetizados por transcripción *in vitro*.

		<i>pet D</i>			<i>psbA</i>		
		(nt)	kDa	U <sub>T</sub>	(nt)	kDa	U <sub>T</sub>
	Completo	216	79.1	86	298	109.1	91
	5'	108	39.5	38	145	53.1	47
	5' T-A	154	56.3	53	204	74.7	64
	T-A	47	17.2	15	59	21.6	17
	T-A 3'	108	39.5	48	153	56.0	44
	3'	61	22.3	33	94	34.4	27

## 2. PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA RECOMBINANTE

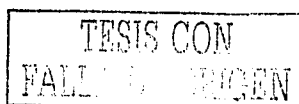
El sistema de QIAexpressionist con vectores pQE (Qiagen, Chastworth, CA) es un sistema para expresar y purificar proteínas recombinantes. El gen que codifica la 24RNP se encuentra en el núcleo y se traduce en el citoplasma. La 24RNP se sintetiza como una pre-proteína que contiene un péptido de tránsito para dirigirla al cloroplasto. Esta secuencia se remueve de la proteína al entrar al cloroplasto y esta adquiere la conformación madura funcional. El gen de la 24RNP de espinaca se clonó en pBS/SK- en el laboratorio del Dr. W. Gruissem (Abrahamson, comunicación personal). Con el objeto de producir 24RNP recombinante en *E. coli*, en nuestro laboratorio subclonamos la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína madura entre los sitios *Bam* HI y *Pst* I del vector PQE30 (pQE-24RNP) empleando la técnica de PCR (Toledo, 1998). La subclonación en este vector permitió la producción de proteína recombinante con una etiqueta de seis histidinas en el extremo amino terminal (His-24RNP). Después de verificar que la secuencia del gen fuera



la correcta y que éste hubiera quedado en la fase de lectura correcta, se transformaron células de la cepa M15, la cual posee el plásmido represor pREP4 que mantiene inhibida la expresión del gen clonado, hasta que se añade IPTG. La purificación de la proteína se basa en la utilización de la resina de níquel (Ni-NTA), que posee una alta afinidad por las histidinas que etiquetan a la proteína recombinante. Se presenta el protocolo con las condiciones de inducción y purificación de la His-24RNP para producirla de forma nativa. Los rendimientos obtenidos son de 8 mg de His-24RNP por litro de medio de cultivo LB con un 90 % de pureza.

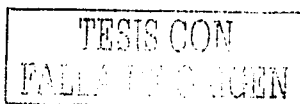
## PROCEDIMIENTO

1. La cepa M15 transformada con pQE-24RNP se inocula en una caja de cultivo con agar LB suplementado con ampicilina 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y kanamicina 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . La cepa se cultiva por 12 horas a 37°C; de esta placa se inocula una colonia a 50 mL de medio LB suplementado con las mismas concentraciones de antibiótico y se cultiva a 37°C con agitación (200 r.p.m.) por un tiempo de 5-6 horas o hasta llegar a una densidad óptica a 600 nm ( $A_{600}$ ) de 0.7-0.9. Con este cultivo se inoculan 2 L de medio LB fresco suplementado con antibióticos y se incuban con agitación durante 3 horas a 33°C o hasta lograr una densidad óptica a  $A_{600}$  de 0.7-0.9.
2. Después de este tiempo se induce la expresión de la proteína recombinante con una concentración final de 0.6 mM de IPTG, dejando el cultivo por 19 horas a 28°C en agitación.
3. El medio con las bacterias se distribuyen en frascos de plástico con capacidad de 250 mL; se centrifugan a 4,700 r.p.m. por 20 minutos a 4°C y se recupera el paquete celular.
4. El paquete celular se resuspende en la solución amortiguadora de sonicación (fosfato de sodio 50 mM y cloruro de sodio 300 mM, pH 8.0). Se utilizó de 5-10 mL de esta solución por 1 g de peso húmedo. Este procedimiento se debe realizar sobre hielo.
5. Congelar las células a -70°C por 1 hora.
6. Descongelar y sonicar las células en hielo a 40 Htz. Se aplican siete pulsos de 1 min de sonicación y 1 min de descanso.
7. Centrifugar a 3,000 r.p.m. por 20 min para separar los restos celulares del sobrenadante y colectar este último. Mantenerlo sobre hielo.



8. Antes de la cromatografía de afinidad, la resina debe equilibrarse de la siguiente manera: la resina Ni-NTA (Qiagen, USA) se homogeniza y se toma 1 mL, se coloca en un vial de 1.5 mL y se centrifuga a 14,000 r.p.m. por 1 min. El sobrenadante se descarta y la resina se lava con 1 mL de solución amortiguadora de sonicación, se deja en agitación por 3 min a 4°C y se centrifuga a 14,000 r.p.m. por 1 min (en 5 ocasiones); finalmente se deja equilibrando en 1 mL de la misma solución amortiguadora en agitación, por 1 hora a 4°C.
9. Se incuba el sobrenadante con 1 mL de la resina Ni-NTA (Qiagen, EUA) equilibrada, y se agregan 5 U de fosfatasa alcalina. Dejar en agitación por 1 hora a 4°C.
10. Después de la incubación, centrifugar a 3,000 r.p.m. por 10 min, retirar el sobrenadante (el sobrenadante se congela para su posterior análisis). La resina se pasa a un vial de 1.5 mL de capacidad y se lava con una solución amortiguadora de lavado (fosfato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 300 mM y glicerol 10% a pH 6.0) previamente esterilizada. Los lavados se realizan adicionando 1 mL de esta solución y dejando en agitación 3 min a 4°C, centrifugar a 14,000 r.p.m. por 1 min en una microfuga refrigerada (en 8 ocasiones); los sobrenadantes son guardados para su posterior análisis.
11. La elución se realiza incubando la resina en agitación con una solución de imidazol 100 mM, 10 min a 4°C y se centrifugar a 14,000 r.p.m. por 1 min (en 3 ocasiones). La solución de imidazol 100 mM se prepara a partir de una solución concentrada de imidazol 1 M disuelta en agua estéril.
12. Para eliminar el imidazol, la proteína se lava con la solución amortiguadora de sonicación y se concentra en un concentrador por centrifugación "centricon" (Amicon, Inc. USA), con una membrana de 10,000 de tamaño de exclusión.
13. Finalmente, la proteína se cuantifica por el método de Bradford y se analiza junto con los sobrenadantes, en un gel desnaturizante de poliacrilamida al 15% (SDS-PAGE).

Como proteína control para los ensayos de entrecruzamiento con luz ultravioleta, se utilizó la proteína N433CTCF que tiene etiquetas de histidinas en el extremo amino y en el carboxilo terminal. Esta proteína es un factor de transcripción sin dominio de unión a DNA. Esta proteína fue facilitada por el Dr. Félix Recillas del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.





### 3. ANALISIS DE PROTEÍNAS

#### 3.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

Esta técnica es muy útil para el análisis de las proteínas presentes en una muestra. Este método se basa en las propiedades de carga y masa de las proteínas para separarlas a través de un polímero, por efecto de la corriente eléctrica. Esta técnica permite determinar la masa molecular aproximada de las proteínas por medio de la comparación con la migración de proteínas de peso molecular conocido (Laemmli, 1970).

#### SOLUCIONES

##### POLIACRILAMIDA 30.8% (100mL)

Acrilamida	30 g
Bisacrilamida	0.8 g

##### SOLUCIÓN AMORTIGUADORA A 25X (100 mL)

Tris base 1.5M	18.17 g
SDS al 20%	2.0 mL
pH 8.8	

##### SOLUCIÓN AMORTIGUADORA B 25X (100 mL)

Tris base 1.5M	18.17 g
SDS al 20%	2.0 mL
pH 6.8	

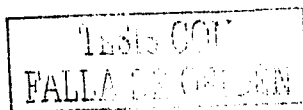
##### SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE MUESTRA 5X (10 mL)

Tris 1M pH 6.8	3.1 mL
Glicerol	5.0 mL
SDS (1% final)	0.5 mL
Azul de bromofenol 10%	0.2 mL

Por cada 20  $\mu$ L de esta solución adicionar 4  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol.

##### SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE CORRIDA 10X (1L)

Tris base	30 g
-----------	------



Glicina 144 g  
SDS 10 g

Utilizar a una concentración de 1X

Persulfato de amonio 20% (APS)

N,N,N',N'-Tetra-metiletilendiamino (TEMED)

Los geles se realizaron de 1 mm de grosor y la electroforesis se llevó a cabo a 25 mA por gel, por un periodo aproximado de 1.5 hrs.

### 3.2. Tinción de proteínas con plata en geles de SDS-PAGE.

Esta técnica fue adaptada del método de entrecruzamiento de RNA:proteína con luz UV (Schuster, 1990).

#### SOLUCIONES

##### SOLUCIÓN 1

Metanol 50%

##### SOLUCIÓN 2

Acido acético 12%

##### SOLUCIÓN 3

Metanol 10%

##### SOLUCIÓN 4

Acido acético 5%

##### SOLUCIÓN 5 (10X)

$K_2Cr_2O_7$  10 g/L

$HNO_3$  2.05 mL/L

##### SOLUCIÓN 6 (100 ml)

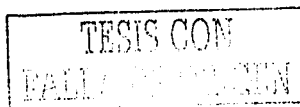
Nitrato de plata 12 mM 0.2 g

Preparar al momento

##### SOLUCIÓN 7

$Na_2CO_3$  0.28 M 14.8 g en 500 mL

Formaldehído al 37% 0.5 mL/L



Preparar al momento

#### SOLUCIÓN 8

Acido acético 3%

#### SOLUCIÓN 9

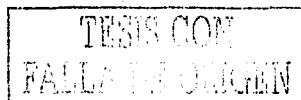
Glicerol 5%

#### PROCEDIMIENTO

1. Fijar el gel en la solución 1 por 10 min. Con agitación continua.
2. Lavar el gel en solución 2 por 5 min.
3. Fijar el gel en la solución 3 por 10min.
4. Lavar el gel en la solución 4 por 5 min.
5. Remojar el gel en 50 mL de la solución 5 en una dilución 1X, por 15 min. Posteriormente, lavar el gel abundantemente con agua desionizada.
6. Remojar el gel en 50 mL de solución 6 (Nitrato de plata) por 15 min. Enjuagar 3 veces con agua desionizada.
7. Lavar el gel rápidamente en dos cambios de solución 7. Agregar un tercer volumen, esperar el revelado. El revelado tarda de 3 a 15 min.
8. Descartar la solución de revelado y detener la reacción agregando 50 mL de la solución 8 por 5 min.
9. Lavar el gel revelado en la solución 9 por 10 min antes de secarlo.

#### 4. TRANSCRIPCIÓN *in vitro* DE LOS DIFERENTES SEGMENTOS DE LOS 3'UTRs

Esta técnica fue descrita por Gruissem y Schuster, 1989. Para la transcripción del 3'UTR de *petD*, el plásmido P2\* se linearizó con la enzima *Xba*I. Posteriormente, se purificó el plásmido previamente separado en un gel de agarosa, empleando el kit correspondiente y se eluyó el DNA con agua destilada y desionizada tratada con di-etil pirocarbonato (DEPC). Este tratamiento se lleva a cabo disolviendo 1 mL de DEPC por cada litro de agua destilada, se deja en agitación toda la noche y se esterilizada por 2 h. ( $H_2O_{DEPC}$ ). Para la transcripción del 3'UTR de *psbA*, el plásmido pBSpsbAS se linearizó con *Bam*HI y se purificó como se describió para *petD*.

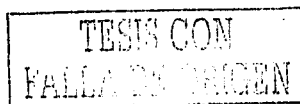


La transcripción de los diferentes segmentos de los 3'UTRs se realizó empleando como moldes los productos de los PCRs purificados. La purificación de los segmentos sintetizados en la transcripción *in vitro* se realizó de la misma manera que para el segmento completo

## PROCEDIMIENTO

1. La reacción de transcripción se realizó en un volumen final de 20  $\mu\text{L}$ ; DTT 40 mM 0.5  $\mu\text{L}$ ; mezcla de rCTP, rATP, rGTP; (Invitrogen, EUA) 5 mM; rUTP 1mM; buffer de la T7 RNA pol (Invitrogen, NY, EUA) 1X; RNasin 40 U (Promega, EUA); DNA como mínimo 400 ng;  $\alpha^{32}\text{P}$ -UTP 20  $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$ , 800 Ci/mmol, 1  $\mu\text{L}$  y para la transcripción de los segmentos 0.5  $\mu\text{L}$ ; T7 RNA polimerasa (Invitrogen, EUA) 50 U/ $\mu\text{L}$ , 1  $\mu\text{L}$ . La reacción se incubó a 37 °C por 2 horas. Si la transcripción se realizó a partir de PCR; esta reacción se incubó con RQ1 RNase-free DNase 1 U (Promega, Madison, EUA) a 37°C por 10 min para degradar el molde.
2. El RNA se precipitó con  $\text{NH}_4\text{OAc}$  5 M 15  $\mu\text{L}$  y etanol absoluto frío 100  $\mu\text{L}$ , se dejó a -20°C por una hora y se centrifugó a 12,000 r.p.m. a 4°C.
3. Se retiró el etanol y se agregó 7  $\mu\text{L}$  de buffer de muestra (xilencianol 0.1%, azul de bromofenol 0.1% en formamida ). La muestra se desnaturizó por calor durante 5 min y se corrió en un gel desnaturizante acrilamida-urea 7 M al 6% en buffer TBE 0.5X.
4. Posterior a la electroforesis, se separó uno de los vidrios y el gel se cubrió con plástico; se expuso a una película fotográfica (aproximadamente 20 seg) para detectar el producto de transcripción el cual es recortado y eluido en una solución de  $\text{NaOAc}$  3 M pH 5.5 20  $\mu\text{L}$ ; EDTA 0.25 M 1  $\mu\text{L}$  y  $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$  180  $\mu\text{L}$ .
5. Se incubó en agitación durante toda la noche a 4°C; posteriormente esta solución que contiene el RNA sintetizado se precipitó con 500  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto frío. El tubo se incubó a -20°C una hora.
6. El RNA se recupera centrifugando a 14,000 r.p.m. por 20 min. El sobrenadante es descartó y el paquete se resuspende en 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ . Se utilizó 1  $\mu\text{L}$  para calcular la concentración del RNA ya sea por cuentas Cerenkov y/o por absrbancia a 260 nm.

Todas las soluciones se prepararon con  $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$  y se esterilizaron.



## 5. ANÁLISIS DE RNAs

### 5.1. Electroforesis de RNA en geles de poliacrilamida desnaturalizante.

Este es un protocolo adaptado de Schuster y Gruissem (1989).

#### SOLUCIONES

##### BUFFER TBE 10X 1L

Tris-base	108 g
Ac. bórico	55 g
EDTA pH 8 0.5 M	40 mL

Disuelto en H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub>

##### SOLUCIÓN A

TBE	0.5X
Urea	7 M
Acrilamida	15 %
Bis-acrilamida	0.75 %

Disuelto en H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub>

##### SOLUCION B

TBE	0.5 X
Urea	7 M

Disuelto en H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub>

APS 20%

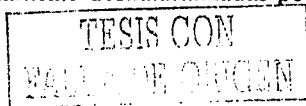
TEMED

#### PROCEDIMIENTO

El tamaño de los geles empleados fué de 18 x 18 x 0.08 cm. Se preparó con la siguiente mezcla:

Solución A	7.5 mL
Solución B	15 mL
APS 20%	55 µL
TEMED	8 µL

Antes de cargar las muestras en el gel, se realizó una precorrida a 1000 V hasta alcanzar una temperatura de 50 °C. Las muestras previamente desnaturalizadas por calor se



cargaron en los pozos y se corrieron a 20 mA. Este tipo de electroforesis se utiliza para la purificación de los RNAs obtenidos por transcripción *in vitro*. El tratamiento del RNA posterior a la electroforesis se describe en la técnica de transcripción *in vitro* en el punto 6.

## 5.2. Entrecruzamiento de RNA-proteína con luz ultravioleta (X-UV).

Esta técnica fue adaptada del publicado por Schuster y Gruissen (1989).

Esta es una metodología que permite la detección de interacciones entre ácidos nucleicos y proteínas. Por esta técnica es posible estimar el tamaño de las proteínas que interactúan con los ácidos nucleicos. En este ensayo las proteínas quedan indirectamente marcadas por su unión con los ácidos nucleicos marcados radiactivamente. El pulso de luz ultravioleta en esta mezcla de reacción produce radicales de purinas y pirimidinas que pueden unirse covalentemente con algún aminoácido cercano como cisteína, serina, metionina, lisina, arginina, histidina, triptofano, fenilalanina y tirosina. Después la mezcla de reacción se trató con RNasa A, con la finalidad de degradar todo el RNA que no haya sido protegido por la unión con la proteína. Finalmente la (s) proteína (s) son analizadas por un SDS-PAGE y una autorradiografía del gel.

### SOLUCIONES

#### BUFFER IVT 20X

MgCl <sub>2</sub>	75 mM
DTT	40 mM
KCl	200 mM

Disuelto en H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub>

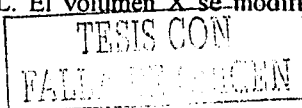
#### BUFFER DE SONICACIÓN

(Ver protocolo de inducción de la 24RNP)

RNasa A	1 µg/µL
---------	---------

### PROCEDIMIENTO

1. La mezcla de unión se realizó a un volumen final de 7.5 µL; buffer IVT 0.37 µL y DTT 40 mM 0.2 µL por reacción. Estos reactivos se mezclaron con el volumen apropiado de RNA sintetizado para cada reacción. Esta mezcla se hace interaccionar con la proteína 24RNP a X µL y con buffer de sonicación a Z µL. El volumen X se modificó para



obtener la concentración de proteína necesaria para el ensayo y el volumen Z es el que al final se ajusta para obtener un volumen final de 7.5  $\mu\text{L}$ . Se dejan interaccionar por 5 min a 4°C.

2. Los tubos se abrieron y se colocaron en un UV-crosslinker (UVP CL-1000). Operado en el modo Energy se proporcionan 2 pulsos de 1.8 Joules.
3. Se agregó 1  $\mu\text{L}$  de RNAsa A y se incubó a 37°C por 20 min.
4. Posteriormente se agregó buffer de carga para muestra (Laemmli), se desnaturalizaron por calor durante 3 min y se cargaron en un gel SDS-PAGE al 15%.
5. La corrida se realizó a 25 mA por un periodo de 1.5-2 horas.
6. El gel se tiñó con plata y se secó.
7. Finalmente se expuso a una placa radiográfica y/o utilizando el equipo Molecular Imagen FX Bio-Rad con el programa Quantity one, para revelar la unión y realizar la densitometría correspondiente con unidades arbitrarias del propio programa denominadas cuentas (CTN).

### 5.3. Geles de retardo.

Esta técnica se basa en la diferencia de velocidades de migración durante la electroforesis de RNA solo con respecto a complejos formados de RNA-proteína, en geles nativos de poliacrilamida (Del Angel, *et al.*, 1989; Carey, 1988).

#### PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

##### SOLUCIONES

BUFFER DE UNIÓN 5X (BB5X) 200 $\mu\text{L}$

H <sub>2</sub> O DEPC	79.5 $\mu\text{L}$
HEPES 1 M	10 $\mu\text{L}$
MgCl <sub>2</sub> 1 M	8 $\mu\text{L}$
DTT 10 mM	2 $\mu\text{L}$
EDTA 200 mM	0.5 $\mu\text{L}$
Glicerol	100 $\mu\text{L}$

BUFFER DE SONICACIÓN (utilizado en la producción de proteína recombinante).

## PROCEDIMIENTO

1. Todos los ensayos de unión se realizaron a 4°C y en un volumen final de 10 µL. Se realiza una mezcla 1, de reacción de unión que contiene por cada ensayo buffer BB5X, 2 µL; RNAsin 0.1 µL y RNA 80 finoles X µL; el volumen X se modifica de acuerdo con la concentración del RNA obtenido por transcripción *in vitro*.
2. Se realizó la mezcla 2, la cual contiene buffer de sonicación Y µL y proteína Z µL, la suma de estos volúmenes debe ajustarse junto con la mezcla 1 a 10 µL. El volumen Z es igual a cero cuando se trata del ensayo de RNA libre; posteriormente este volumen se incrementa conforme aumenta la concentración de proteína en cada ensayo. El volumen Y se ajusta de acuerdo a cada concentración de proteína a ensayar.
3. La mezcla 1 se incorpora a cada ensayo de la mezcla 2 y se incuban por un periodo de 5 minutos antes de la electroforesis. Las muestras no se agitan ni se centrifugan.

## PREPARACIÓN DEL GEL

### SOLUCIONES

POLIACRILAMIDA 16.2% (100 mL)

Acrilamida 16 g

Bisacrilamida 0.2 g

Disuelto en H<sub>2</sub>O DEPC

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA TBE 10X (1L)

Tris-base 108 g

Ácido Bórico 55 g

EDTA 0.5 M pH 8 40 mL

Disuelto en H<sub>2</sub>O DEPC

Persulfato de amonio 20% (APS)

TEMED

## PROCEDIMIENTO

Se realizaron geles de poliacrilamida al 6% de dimensiones 18 x 18 x 0.3 cm, la preparación se realizó como se indica a continuación.

Buffer TBE 10X 1.5 mL

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Acrilamida-bisacrilamida	11.25 mL
H <sub>2</sub> O DEPC	17.25 mL
APS 20%	150 µL
TEMED	45 µL

Los pozos del gel son lavados minuciosamente con buffer TBE 0.5X el cual es también utilizado para la corrida. Las condiciones de electroforesis fueron de corriente constante a 25 mA por un tiempo de 1.5-2.5 hrs. Posteriormente el gel se secó y se expuso en una placa radiográfica para su posterior evaluación.

## 6. ANÁLISIS MATEMÁTICO DE LOS RESULTADOS Y CÁLCULOS DE LAS CONSTANTES DE DISOCIACIÓN APARENTES ( $K_{d,app}$ )

El análisis cinético de los ensayos de X-UV se realizó en el programa Origin versión 5.0. El ajuste de los datos se realizó de manera no lineal utilizando ya sea el modelo hiperbólico representado por la ecuación de Michaelis y Menten o el modelo sigmoide representado por la ecuación de Hill. Para el análisis de las constantes de disociación aparentes en los ensayos de retardo se utilizó el programa de computación Dynafit. Este es un programa que fue desarrollado como herramienta para describir mecanismos de cinética química, cinética enzimática o unión de ligando y receptor; el programa realiza un análisis estadístico y simulación para graficar velocidades iniciales o el curso de una reacción para un mecanismo molecular arbitrario representado simbólicamente por una serie de ecuaciones químicas. Este programa es capaz de realizar simultáneamente el proceso de un gran número de curvas las cuales pueden contener hasta 16,000 diferentes datos. La molecularidad de los pasos de reacción en el mecanismo puede ser desde cero hasta cuatro. Este programa utiliza un lenguaje de programación para datos científico (ANSI Fortran-77), puede ser utilizado en diversos hardwares (IBM-PC, Macintosh) y está disponible vía internet en la dirección [uwmm1.pharmacy.wisc.edu](http://uwmm1.pharmacy.wisc.edu). (Kuzmič, 1996).

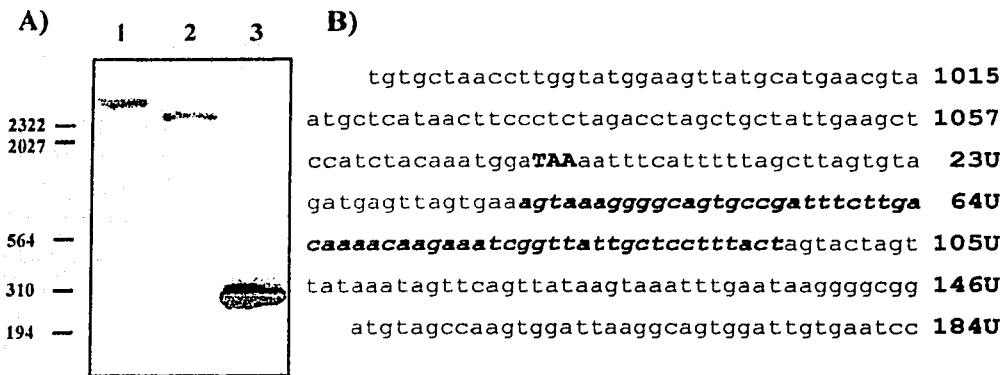
TESIS CON  
FALLA DE COPIEN

# RESULTADOS

## 1. CARACTERÍSTICAS DE LOS 3'UTRs

### 1.1. El 3' UTR de *psbA*.

Por PCR se amplificó la secuencia 3'UTR del gen *psbA* empleando los iniciadores que contenían sitios de restricción específicos para cada extremo. Este producto fue de 287 pb y comprendía 96 pb de la secuencia codificadora y 184 pb de la región 3'UTR. Los extremos de este producto se digirieron con *Kpn I/Bam HI* para clonarlo en el plásmido pBluescript II SK (+/-) bajo la secuencia promotora de la RNA polimerasa T7. Este plásmido recombinante se nombró pBS<sub>psbAS</sub>. La clonación y secuencia se verificó mediante la obtención del inserto (Figura 9 A, carriles 2 y 3) y la secuenciación del mismo respectivamente (Figura 9 B).



**Figura 9. Clonación del 3'UTR de *psbA* de espinaca.** A) Negativo del gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. Carril 1) plásmido con inserto; carril 2) plásmido con inserto restringido con *Kpn I/Bam HI*; carril 3) PCR a partir del plásmido del carril 1. B) Secuencia del 3'UTR de *psbA*. En negritas y mayúsculas se indica el codón de término de la traducción. En negritas y cursiva, la secuencia que forma el tallo-asa. La numeración corresponde a la secuencia del gen a partir del codón de inicio para el primer aminoácido; la numeración con "U" indica la secuencia 3' UTR.

Para la síntesis del transcrito radioactivo, el plásmido se linearizó en el sitio *Bam HI* y se montó una reacción de transcripción *in vitro*. El producto de la transcripción *in vitro*

fue de aproximadamente 292 nt (287 del 3'UTR mas 5 nt del vector), con un tamaño estimado de 106.9 kDa.

### 1. 2. El 3'UTR de *petD*.

El plásmido p2\* presenta la secuencia 3'UTR clonada bajo el promotor de la RNA polimerasa T7. El producto de la transcripción *in vitro* tiene aproximadamente 216 nt; contiene 78 nt de la secuencia codificadora y 138 nt de la secuencia 3'UTR. El tamaño estimado de esta molécula es 79.1 kDa. En la Figura 10 se presenta la secuencia del fragmento 3'UTR completo.

```
406 ggtaccgtagtgccctttggttaggtattggagcaacattacctattg 454
455 ataaatccctaactttaggcctttttTAAattgatattaattatgaaata 20U
21U acacggcgtgtgtatctagggaa tagtcacttcaacgtgaattttccct 69U
70U agatacatctattcaattactttttttcatctttttattttttaaatcaa 118U
119U ttacgaaatgctttttctaga
```

Figura 10. Secuencia del 3'UTR de *petD*. En negritas y mayúsculas se indica el codón de término de la traducción, en negritas y cursiva, la zona del tallo-asa. La numeración corresponde a la secuencia del gen a partir del codón de inicio para el primer aminoácido; la numeración con "U" indica la secuencia 3' UTR.

### 1.3. Transcripción *in vitro* de los diferentes segmentos de los 3'UTRs.

Los diferentes segmentos de los 3'UTRs se amplificaron por PCR empleando iniciadores específicos que incluían la secuencia del promotor de la RNA polimerasa T7 en el lado 3' correspondiente y posteriormente se emplearon como moldes para realizar la transcripción *in vitro*. Los RNAs sintetizados se separaron en un gel de acrilamida desnaturizante y posteriormente se purificaron. En la Figura 11 se presentan las autoradiografías de las bandas de los diferentes transcritos sintetizados *in vitro*, después de separarse en los geles de poli acrilamida desnaturizante y sus estructuras secundarias. Figura 11A, segmentos correspondientes de *psbA*, Figura 11 B, segmentos de *petD*.

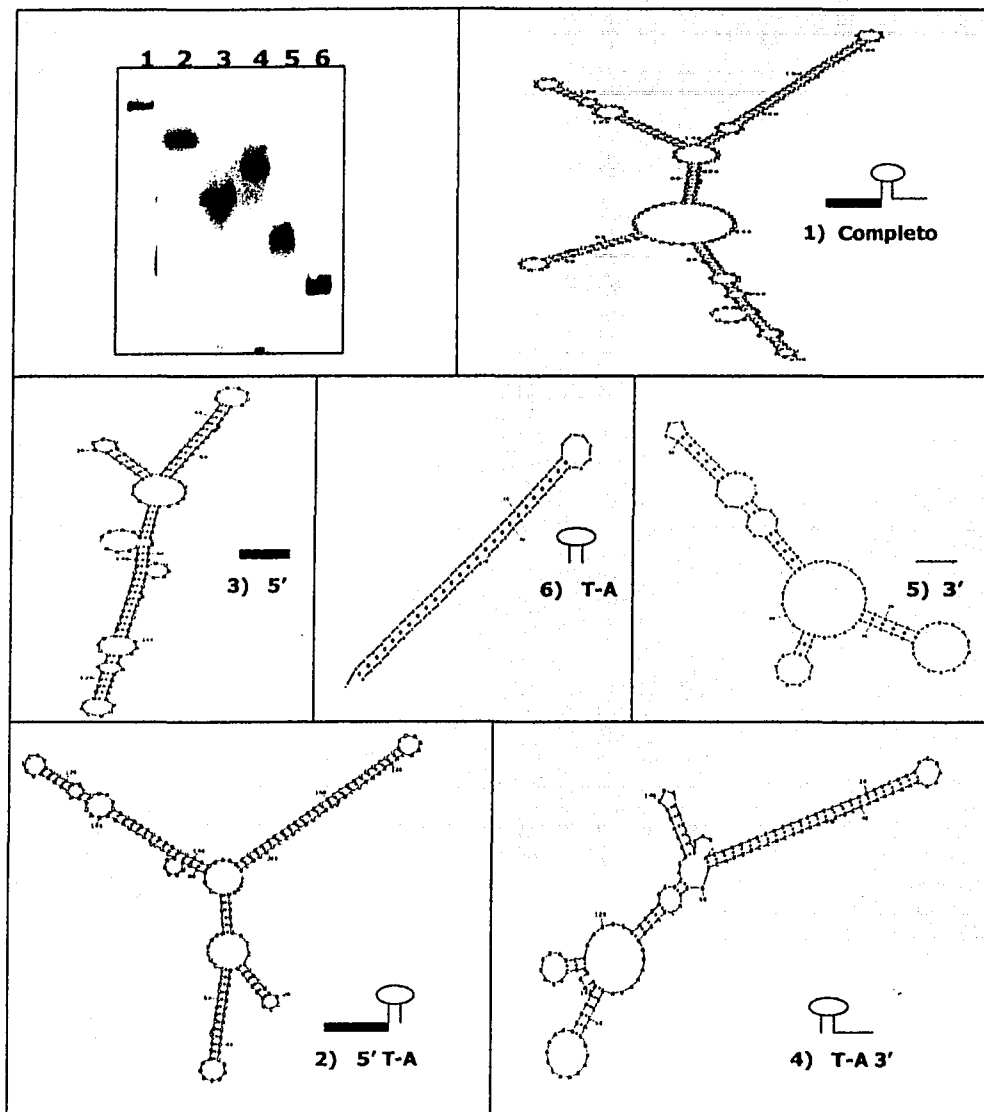


Figura 11. A) Transcritos de RNAs obtenidos *in vitro* de *psbA* y sus estructuras secundarias teóricas. Autorradiografía de los fragmentos sintetizados y sus estructuras teóricas más estables ( $\Delta G$  más negativos). Los plegamientos se realizaron en el sitio [www.bioinfo.rpi.edu/zukerm/rna/](http://www.bioinfo.rpi.edu/zukerm/rna/). Los números en paréntesis corresponden al número del carril en el gel. Las figuras no se encuentran en la misma escala y la secuencia de cada estructura puede ser vista en detalle en el apéndice 2.

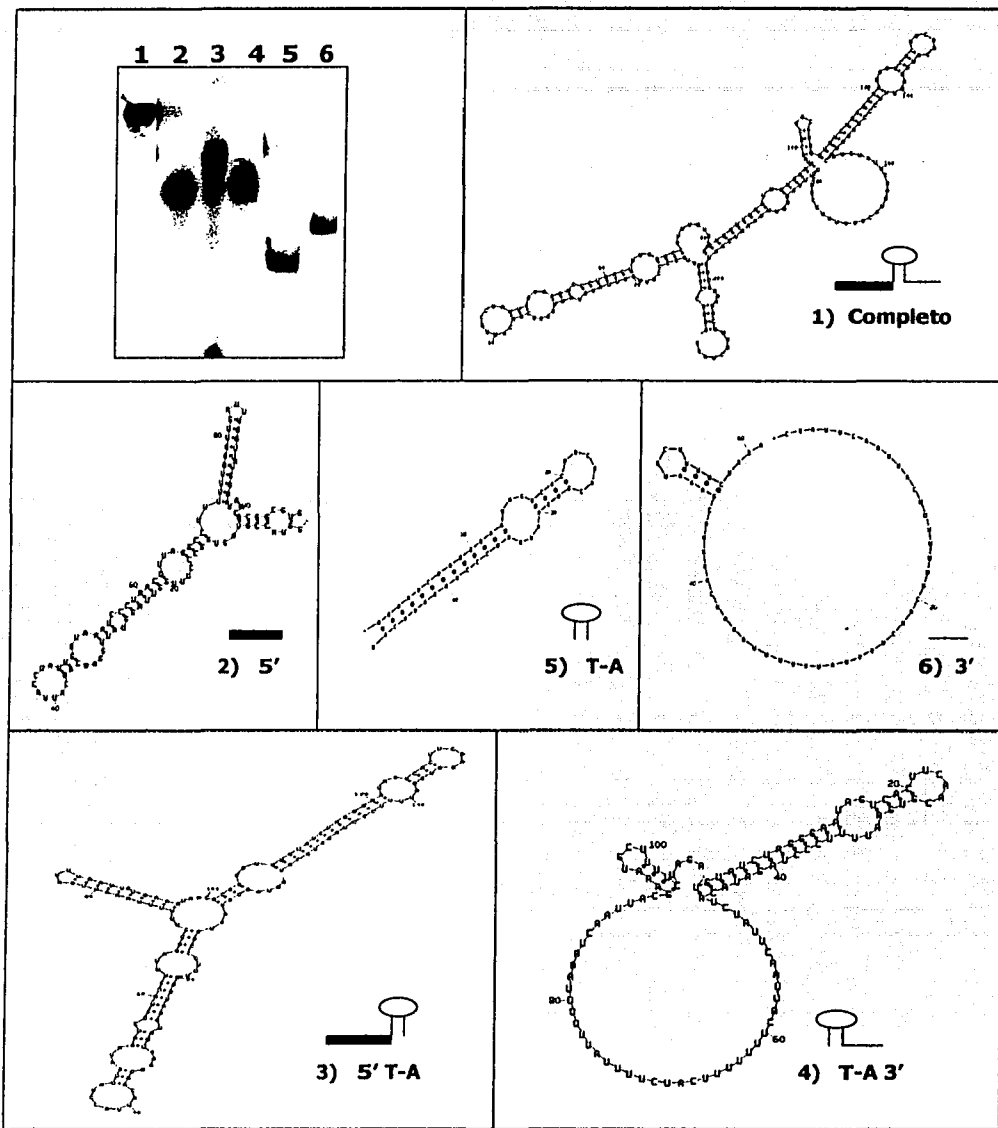
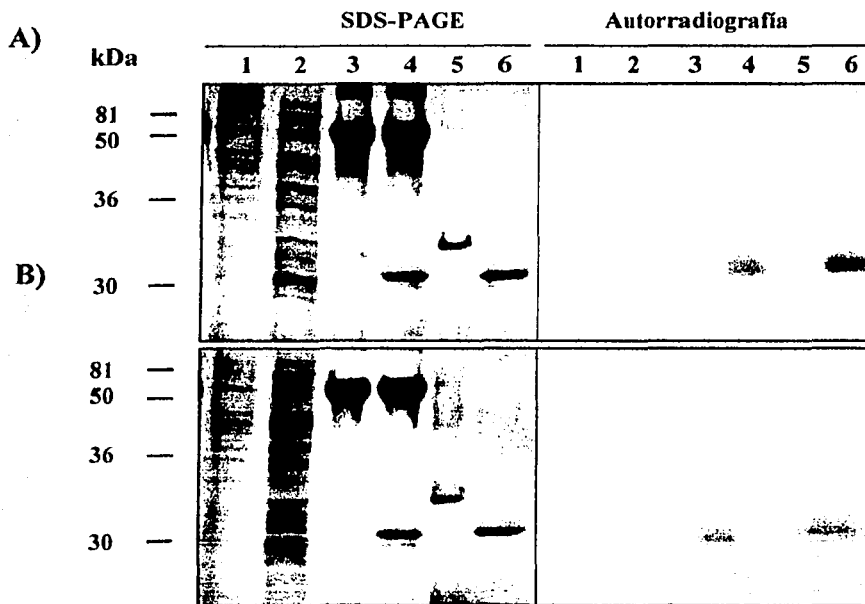


Figura 11. B) Transcritos de RNAs obtenidos *in vitro* de *petD* y sus estructuras secundarias teóricas. Igual que la figura 11 A, pero correspondiente a *petD*. La secuencia de cada estructura puede ser vista en el apéndice 3.

## 2. ANÁLISIS DE LA UNIÓN DE LA 24RNP RECOMBINANTE A LOS 3'UTRs DE *psbA* Y *petD* *in vitro*.

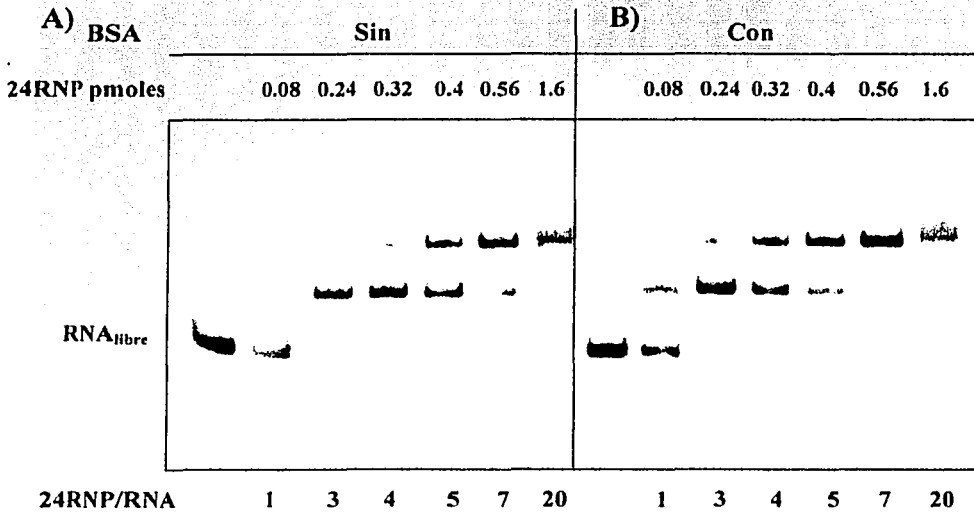
Una vez transcrito los segmentos 3'UTRs de los genes *petD* (Stern y Gruissem, 1987) y *psbA* de espinaca, se realizó los experimentos de unión proteína-RNA empleando la técnica de entrecruzamiento con luz ultravioleta (X-UV) (Figura 12).



**Figura 12. Controles de unión de los extremos 3'UTRs de *psbA* y *petD*.** Los 3'UTRs de *psbA* y *petD* radioactivos se entrecruzaron por luz UV con diferentes proteínas. Se emplearon 1.7 µg de extractos bacterianos (carriles 1 y 2), 1.4 µg de proteínas recombinantes (carriles 4, 5 y 6) y 3 µg de BSA (carriles 3 y 4). La unión se ensayó con 2 fmol de RNA marcado. En el lado izquierdo de la figura se presentan los SDS-PAGEs teñidos con plata, a la derecha las autorradiografías. **A)** Unión al extremo 3'UTR de *psbA*. Carril 1) extracto proteico de la cepa *E. coli* M15; carril 2) extracto proteico de *E. coli* M15, transformada con el vector sin inserto e inducida con IPTG; carril 3) albúmina de suero bovina (BSA); carril 4) 24RNP recombinante en presencia de BSA; carril 5) proteína recombinante N433CTCF con etiquetas de histidinas en los extremos amino y carboxilo terminal; carril 6) 24RNP recombinante. **B)** Unión al extremo 3'UTR de *petD*. Los carriles corresponden a los experimentos descritos en A).

Los resultados muestran que: a) la 24RNP recombinante se une eficientemente a los 3'UTRs de *psbA* y *petD* (Figura 12, A y B carril 6), b) ninguna proteína de la cepa M15 de *E. coli* empleada para producir la 24RNP recombinante, fue capaz de unirse a los 3'UTRs probados (Figura 12, carriles 1 y 2), c) aún con grandes cantidades de BSA (proteína cohesiva), en el ensayo, no hubo unión a los 3'UTRs (Figura 12, carriles 3 y 4), d) la presencia de altas concentraciones de BSA no interfiere con la unión de la 24RNP a los 3'UTRs (Figura 12, carril 4); e) otra proteína recombinante con doble etiqueta de histidinas no une RNA (Figura 12, carril 5).

También se realizó un ensayo de retardo utilizando el extremo T-A 3' de *psbA* en presencia de BSA, observándose que la presencia de esta proteína no modifica la unión de la 24RNP al RNA ni afecta los resultados del ensayo (Figura 13).



**Figura 13. Unión de la 24RNP al extremo T-A 3' de *psbA*, analizado en gel de retardo.** En los ensayos se emplearon 80 fmoles de RNA radioactivo y concentraciones variables de 24RNP. **A)** Unión de 24RNP con RNA, sin BSA. Carril 1, RNA sin proteína; carril 2, 80 fmoles de 24RNP; carril 3, 240 fmoles; carril 4, 320 fmoles; carril 5, 400 fmoles; carril 6, 560 fmoles; carril 7, 1.6 pmoles de 24RNP. **B)** Unión de 24RNP con RNA, en presencia de 7.9 pmoles de BSA. Los carriles contenían las cantidades de proteína descritas en A.

### 3. INTERACCIÓN DE LA 24RNP CON LA ESTRUCTURA SECUNDARIA DE LOS 3'UTRs.

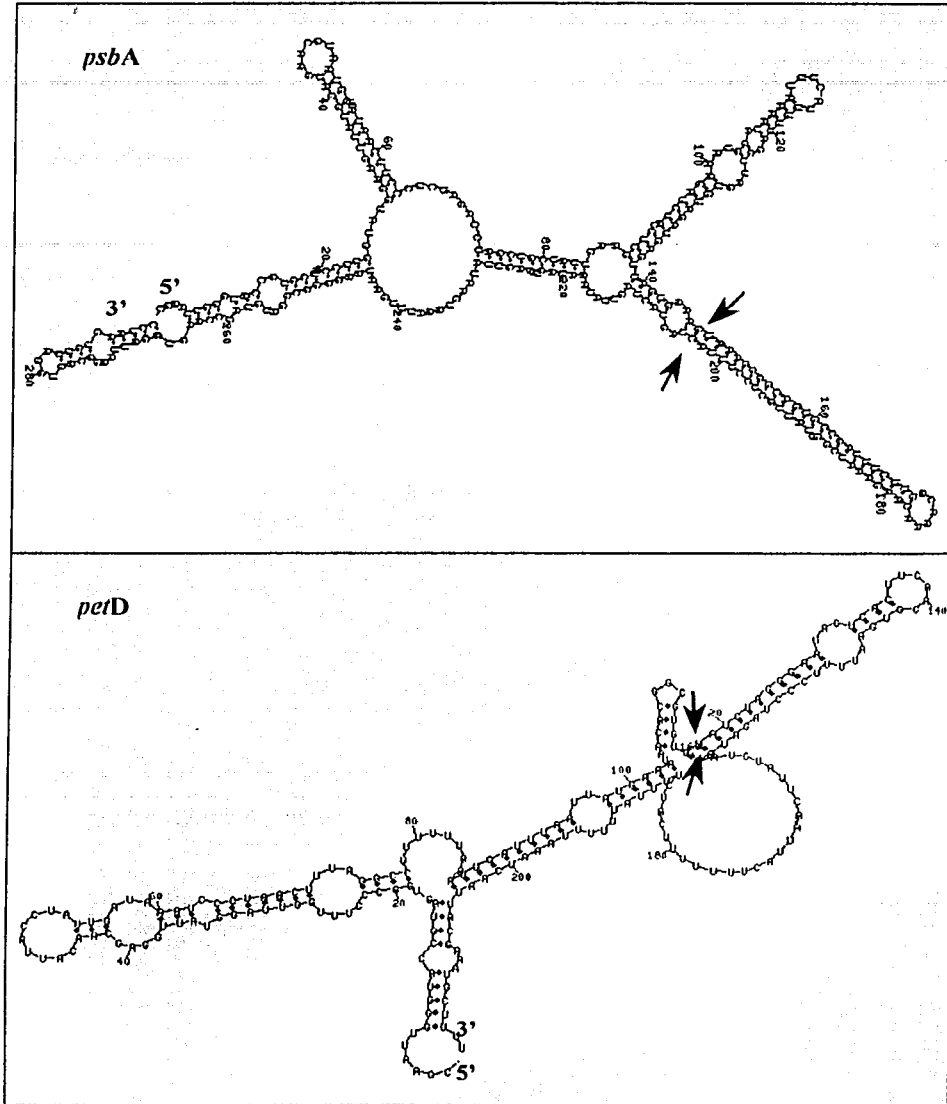
TESIS COM  
FALLA

### 3.1. Análisis teórico de las estructuras secundarias en los 3'UTRs.

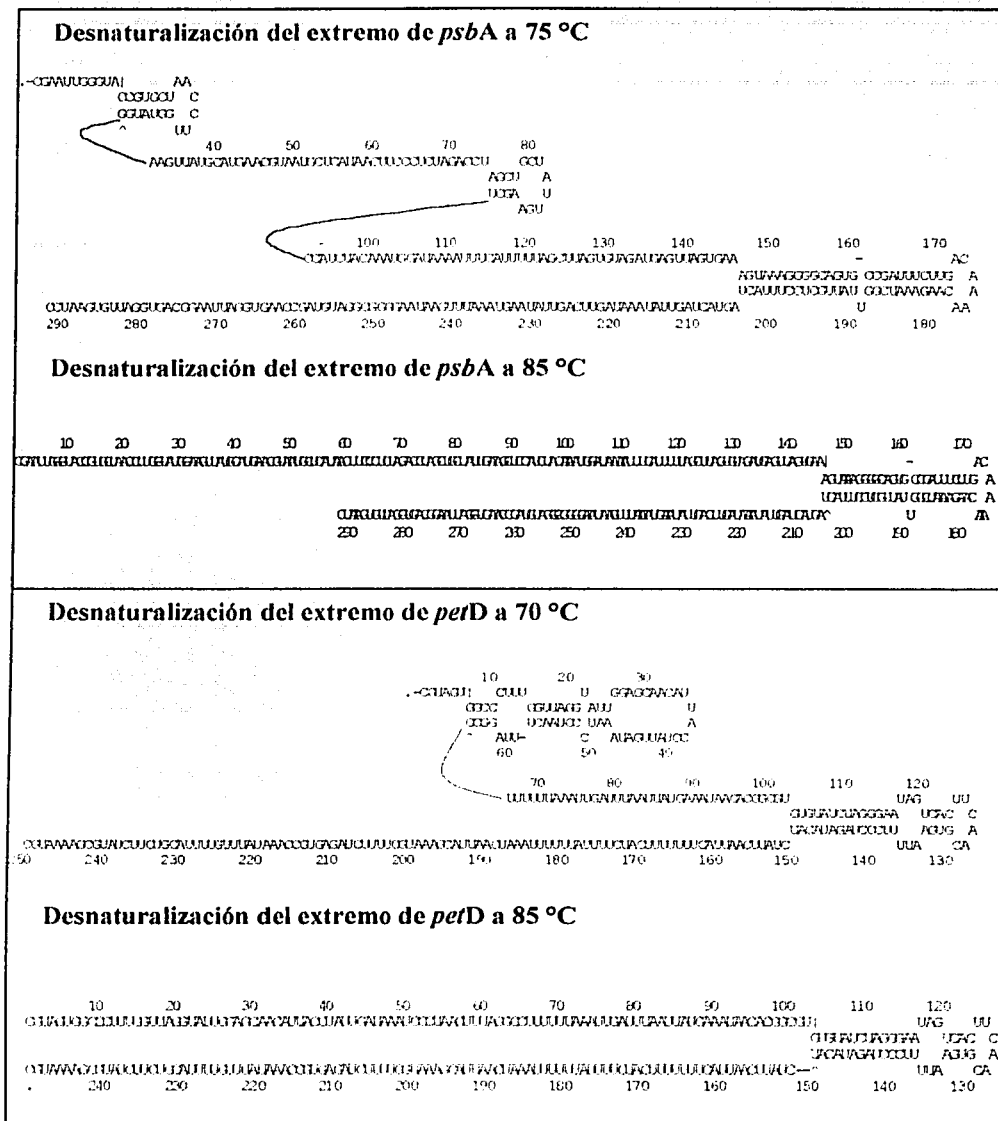
Se ha descrito la relevancia de la estructura secundaria del RNA en la unión con las proteínas, por lo que en este trabajo se planteó el estudio de la participación de las estructuras secundarias en la unión de la 24RNP con los 3'UTRs. Para esto se realizó la unión de la 24RNP a los 3'UTRs con diferentes grados de desnaturalización. Inicialmente se realizó un análisis teórico de las estructuras secundarias presentes en los 3'UTRs para determinar a que temperatura estas estructuras se desnaturalizaban. Esto se realizó utilizando el algoritmo de mfold en el sitio [www.bioinfo.rpi.edu/zukerm/rna/](http://www.bioinfo.rpi.edu/zukerm/rna/), al cual se enviaron a plegar las secuencias de los 3'UTRs de *petD* y *psbA*. En la Figura 14 se muestran los plegamientos teóricos de las conformaciones más estables a 25 °C. La predicción teórica, las estructuras tipo tallos (doble cadena de RNA), asas y burbujas (cadenas sencillas de RNA), concuerda con el mapeo con RNAsas publicado por Stern *et al.* (1989), en el cual se determina que el tallo-asa más estable corresponde al extremo 3' maduro del mensaje.

Posteriormente, en el mismo sitio electrónico, se realizó el análisis teórico de la estabilidad de las estructuras secundarias, simulando su plegamiento a diferentes temperaturas. Se probaron varias temperaturas, pero solo se presentan las estructuras de las moléculas a temperaturas mayores a 70 °C, que es donde la mayoría de ellas se desnaturalizan (Figura 15). La estructura tallo-asa más estable, que corresponde al 3' del mensaje maduro, se mantiene aún a temperaturas tan altas como 85 °C. Con los datos obtenidos de este análisis, se realizaron experimentos de desnaturalización por calor de los 3'UTRs, determinando la absorbancia a 260 nm. Estos ensayos de hipercromicidad se realizaron en un espectrofotómetro controlado por computadora (UV-1601, Shimadzu). Se observó un aumento de la absorbancia a 85 °C, lo que indica la desnaturalización de la molécula. Esta mayor absorbancia de los 3'UTRs a 85°C, se mantuvo después de incubarse durante 10 min en hielo, lo que indica que los RNAs se mantienen desnaturalizados en esta condición.





**Figura 14. Predicción de las estructuras secundarias de los 3'UTRs de *psbA* y *petD*.** Las secuencias de los 3'UTRs fueron analizadas en el sitio [www.bioinfo.rpi.edu/zukerm/ma/](http://www.bioinfo.rpi.edu/zukerm/ma/) en donde fueron plegadas en su conformación más estable a 25 °C. Las flechas indican la estructura tallo-asa de alta estabilidad, que es hasta donde se lleva a cabo el procesamiento de los extremos 3'UTRs para producir los mensajes maduros.

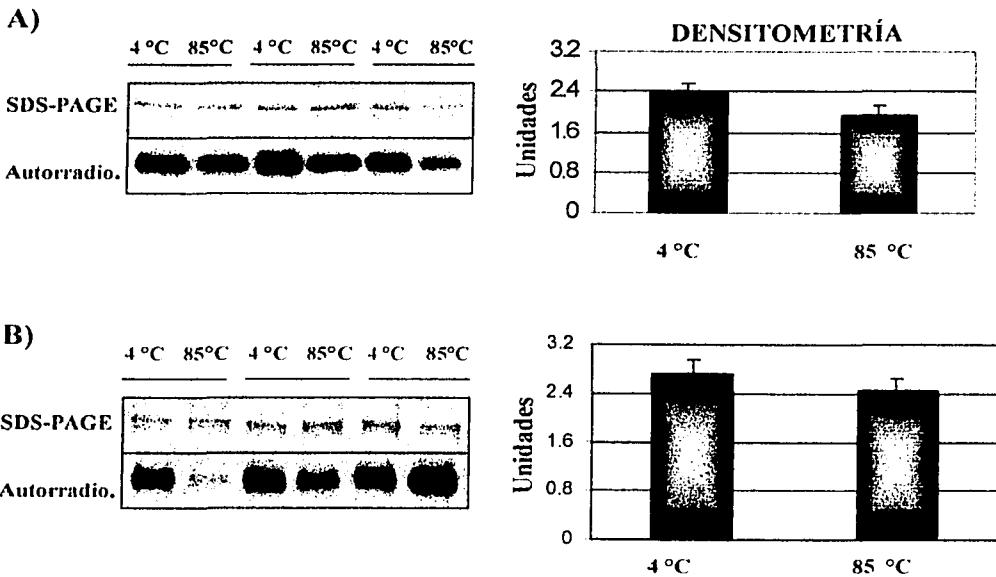


**Figura 15. Predicción de la desnaturalización por calor de los 3'UTRs de *psbA* y *petD*.** Análisis teórico de la desnaturalización de las estructuras secundarias a diferentes temperaturas ([www.bioinfo.rpi.edu/zukerm/mna](http://www.bioinfo.rpi.edu/zukerm/mna)). Esta figura presenta dos diferentes temperaturas en donde se observa la pérdida de las estructuras secundarias con menor estabilidad y la temperatura más alta a la cual todavía se conserva la estructura tallo-asa (85°C).

TESIS COMPLETA  
FALLA DE CALIFICACION

### 3.2. Unión de la 24RNP a los 3'UTRs desnaturalizados.

Con la información obtenida, se llevó a cabo experimentos de unión de la 24RNP a los 3'UTRs con su estructura plegada y desnaturalizada por calor a 85 °C y enfiada, empleando la técnica de X-UV. Los ensayos de las interacciones proteína RNA se realizaron a 4 °C y se repitieron al menos tres veces. El análisis estadístico de los resultados empleando la prueba t de Student no reveló diferencia significativa ( $p=0.1$  para *psbA*;  $p=0.56$  para *petD*) en la unión con los RNAs plegados o desnaturalizados los cuales aún conservan la estructura tallo-asa (Figura 16).



**Figura 16. Unión de la 24RNP a los extremos 3'UTRs a diferentes temperaturas. A)** Unión con el extremo 3'UTR de *psbA*. Se presentan el gel de SDS-PAGE teñido con plata y la autorradiografía de la unión realizada a 4 °C sin desnaturalizar y con la estructura previamente desnaturalizada a 85 °C. Se utilizaron 20 pmoles de proteína (500 ng) y 40 fmoles de RNA marcado. **B)** Unión con el extremo de *petD* bajo las mismas condiciones ensayadas en A.

### 3.3. Unión de la 24RNP a los 3'UTRs en presencia de competidor.

Para conocer la afinidad de la 24RNP por su RNA blanco se realizaron ensayos de competencia con tRNA de levadura. Estos ensayos se realizaron entrecruzando a la proteína en presencia de concentraciones crecientes de tRNA como competidor (50 a 20,000 veces más) y con el RNA desnaturalizado por calor (Figura 17). Los ensayos de competencias se realizaron en condiciones similares a las publicadas anteriormente (Stern *et al.*, 1989).

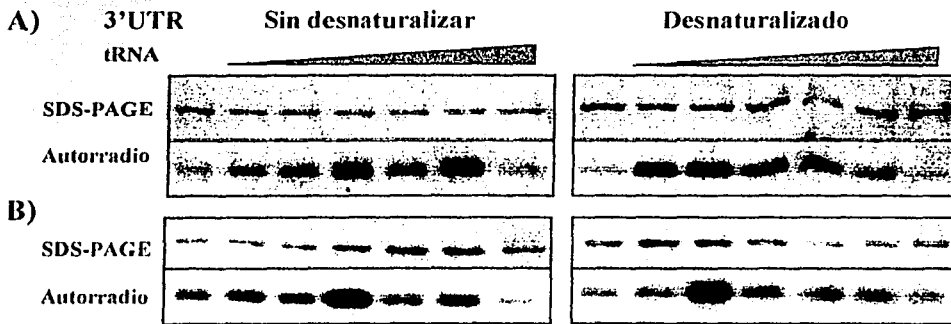


Figura 17. Unión de la 24RNP a los extremos 3'UTRs, a diferentes temperaturas y con tRNA como competidor. A) Gel SDS-PAGE y autorradiografía obtenida de la unión realizada con el extremo de *psbA* a 4 °C sin desnaturalizar y con la estructura previamente desnaturalizada a 85 °C, en concentraciones crecientes de tRNA en los dos casos. En este ensayo se utilizaron 20 pmoles de 24RNP (500 ng), 2 fmoles de RNA marcado y 50, 100, 200, 1,000, 2,000 y 20,000 veces más (0.1, 0.2, 0.4, 2, 4 y 40 pmoles) de tRNA como competidor. B) Unión con el extremo *petD* bajo las mismas condiciones ensayadas para *psbA*.

En este ensayo se observó la selectividad de la 24RNP por su blanco. En todos los casos, con excepción de 20,000 veces más tRNA que 3'UTR (Figura 17, último carril), la unión de la 24RNP a los 3'UTRs blanco no disminuyó en presencia del competidor, ni en los experimentos con RNA plegado o RNA desnaturalizado (Figura 17, comparar carril sin competidor con los otros carriles, en todos los casos). En algunos casos, se observa un aumento en la unión al RNA blanco en presencia de competidor.

## 4. UNIÓN DE LA 24RNP AL 3'UTR DE *psbA* ANALIZADA POR X-UV.

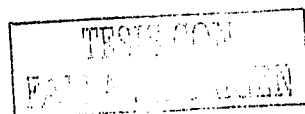
### 4.1. Unión de la 24RNP al 3'UTR de *psbA* completo.

Se realizó la unión de la 24RNP con el 3'UTR completo de *psbA* empleando ensayos de X-UV, tal como se describe en la sección 5.2 de Materiales y Métodos. En estos ensayos se emplearon cantidades constantes de RNA y cantidades variables de la 24RNP (Figura 18 A). Estos experimentos se repitieron al menos tres veces.

Con los datos de la densitometría de las bandas, se construyó una gráfica de la fracción unida con respecto a la concentración de proteína. Estos datos se analizaron por medio de regresión no lineal, ajustando los datos a la ecuación de Hill, a una doble ecuación de Hill, utilizando el programa Origin 5.0. La unión de la proteína muestra una tendencia sigmoide, lo que indica que su unión es cooperativa. Además el ajuste a la doble ecuación de Hill muestra dos componentes, el primero con una  $K_{0.5}$  de  $0.95 \mu\text{M}$  y el segundo con una  $K_{0.5}$  de  $4.75 \mu\text{M}$ ; esto indica la presencia de un componente de mayor afinidad que el segundo. Los valores de unión máxima ( $B_{\text{máx}}$ ) fueron 9 veces más grandes para el segundo componente que para el primero (10.7 y 1.07 unidades relativas de fracción unida, respectivamente). Por otro lado, los valores de  $n$ , que representan el número de Hill, fueron mayores a 6 para ambos componentes, lo que indica que al menos seis subunidades podrían estarse uniendo al RNA (Figura 18 B).

### 4.2. Unión de la 24RNP a diferentes segmentos del 3' UTR de *psbA*.

Para determinar si la 24RNP era capaz de unirse a los diferentes segmentos de los 3'UTRs, o si sólo reconocía una región específica a lo largo del fragmento completo, se realizaron diferentes ensayos de X-UV, seccionando los extremos completos y produciendo segmentos de RNA más cortos marcados radiactivamente (Figura 8, Tabla 3). Los resultados se analizaron por densitometría y los valores para cada medición se analizaron de acuerdo con el número de uracilos marcados radiactivamente incorporados a cada segmento (Tabla 3). Los valores obtenidos se graficaron y se presentan en la Figura 19. Todos los resultados se analizaron con el programa Origin 5.0. Con base en las curvas obtenidas, los datos del segmento 5' y 5' TA se analizaron con el modelo de Hill, mientras



que la unión a los segmentos T-A, 3' y T-A 3' se analizaron ajustando los datos a la ecuación de Michaelis Menten.

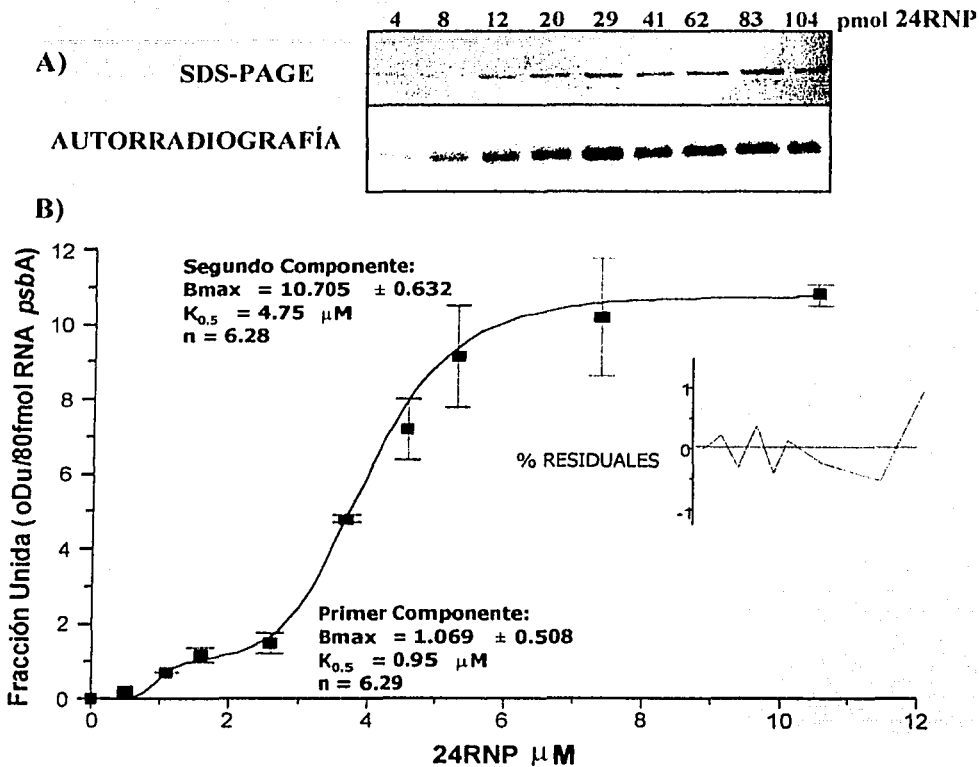
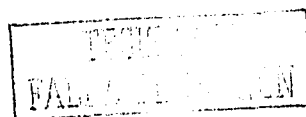


Figura 18. Ensayo de unión de la 24RNP al segmento 3'UTR de *psbA*. A) SDS-PAGE teñido con plata y autorradiografía del X-UV. Se utilizaron concentraciones de 4 a 104 pmol (0.1-2.5  $\mu g$ ) de 24RNP y 80 finol del transcrito por ensayo. B) Gráfica construida a partir de los datos en A. Las barras representan la desviación estándar de al menos tres repeticiones. El inserto en la gráfica representa el porcentaje de residuales obtenidos del ajuste al modelo empleado.



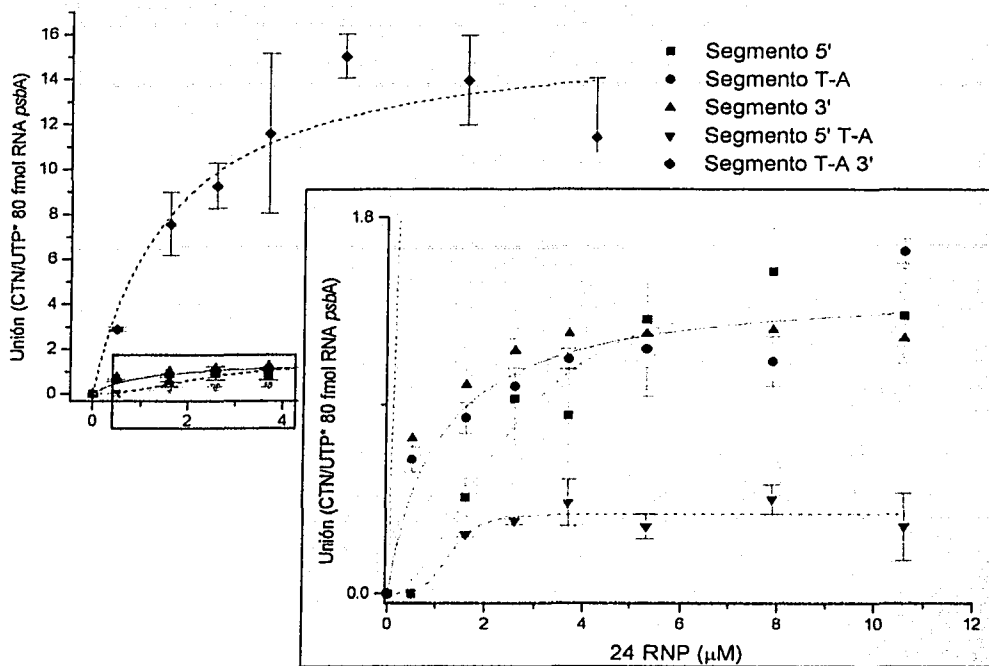


Figura 19. Gráfica de los datos obtenidos a partir del X-UV con los diferentes segmentos. Por las diferencias de escalas del segmento T-A 3' con respecto a los demás segmentos, los datos para estos últimos se presentan en el inserto.

En la Tabla 4 se presentan los datos de unión máxima ( $B_{\text{máx}}$ ),  $K_{0.5}$  y el número de Hill ( $n$ ), para los diferentes segmentos.

Tabla 4. Parámetros de unión a los diferentes segmentos de *psbA*

Segmento	Unión Máxima (CTN/UTP* 80 fmol RNA)	$K_{0.5}$ ( $\mu\text{M}$ )	Número $n$	$\chi^2$
5'	$1.52 \pm 0.2$	$2.45 \pm 0.5$	$2.0 \pm 0.7$	0.00568
T-A	$1.47 \pm 0.9$	$0.94 \pm 0.3$	1	0.00879
3'	$1.32 \pm 0.6$	$0.41 \pm 0.07$	1	0.00078
5' T-A	$0.38 \pm 0.06$	$1.29 \pm 0.6$	$4.87 \pm 9.6$	0.00392
T-A 3'	$16.1 \pm 1.2$	$1.63 \pm 0.7$	1	1.23175

Los resultados muestran que mas proteínas se unen al fragmento T-A 3' en comparación con los demás segmentos. Sin embargo, la proteína presentó mayor afinidad

Los resultados muestran que mas proteínas se unen al fragmento T-A 3' en comparación con los demás segmentos. Sin embargo, la proteína presentó mayor afinidad por los segmentos 3' y T-A. Las uniones a los segmentos 5' y 5' T-A mostraron comportamiento cooperativo. La afinidad por los segmentos compuestos fue parecida entre sí.

## 5. UNIÓN DE LA 24RNP AL 3'UTR DE *petD* ANALIZADA POR X-UV.

### 5.1. Unión de la 24RNP al 3'UTR completo de *petD*.

Este análisis se realizó previamente en nuestro laboratorio como trabajo de tesis de Maestría de Edith Díaz Mireles (2000). En este ensayo se observó un comportamiento parecido al presentado para el 3'UTR de *psbA*. Estos datos se muestran en el apéndice 1.

### 5.2. Unión de la 24RNP a diferentes segmentos del 3'UTR de *petD*.

Los datos de unión obtenidos por X-UV para los diferentes segmentos de *petD* (Figura 8, Tabla 3) se analizaron de manera similar a los de *psbA*. Los datos se normalizaron por el número de uracilos en cada molécula y se presentan en la Figura 20.

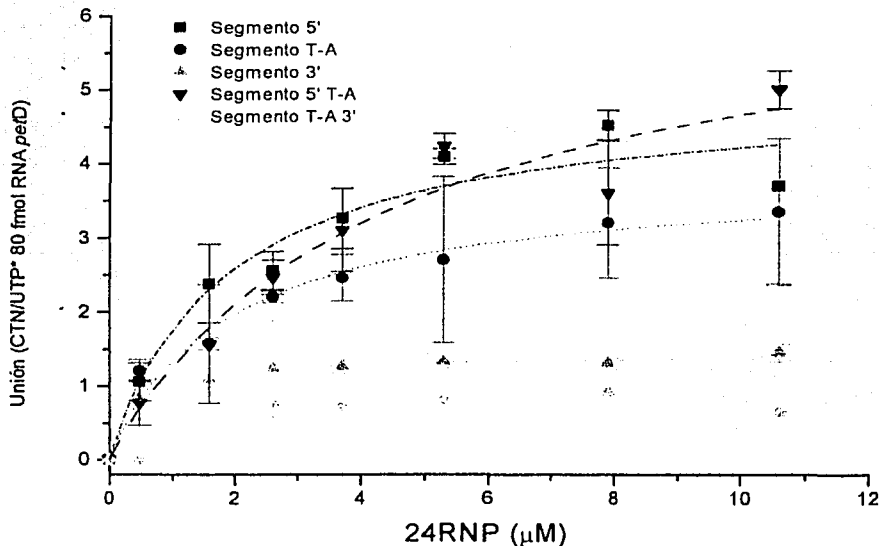
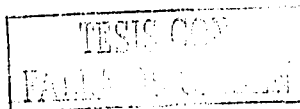







Figura 20. Tendencia de los datos obtenidos a partir del X-UV, con los diferentes segmentos.





Los resultados de los segmentos 5', T-A, 5' T-A y 3' se analizaron con el modelo de Michaelis Menten, mientras que el segmento T-A 3' se analizó con la ecuación de Hill. Los parámetros se presentan en la Tabla 5.

**Tabla 5. Parámetros de unión a los diferentes segmentos de *perD***

Segmento	Unión Máxima (CTN/UTP* 80 fmol RNA)	K <sub>0.5</sub> (μM)	Número n	χ <sup>2</sup>
5' 	5.01 ± 0.4	1.87 ± 0.6	1	0.07384
T-A 	3.84 ± 0.4	1.94 ± 0.4	1	0.00217
3' 	1.41 ± 0.2	0.41 ± 0.1	1	0.00578
5' T-A 	6.69 ± 0.7	4.38 ± 1.5	1	0.15833
T-A 3' 	0.78 ± 0.05	1.29 ± 0.4	4.96 ± 8.3	0.00918

La unión máxima a este mensaje fue mayor en el segmento 5' T-A, posteriormente en los segmentos sencillos y con menor unión a segmento T-A 3'. Estos resultados son diferentes a los obtenidos con el extremo de *psbA*. La 24RNP presentó una mayor afinidad por el extremo 3', tuvo una afinidad semejante por el T-A 3', 5' y T-A y una afinidad 10 veces menor que para el más afin, por el 5' T-A. Este comportamiento es semejante al presentado por *psbA*.

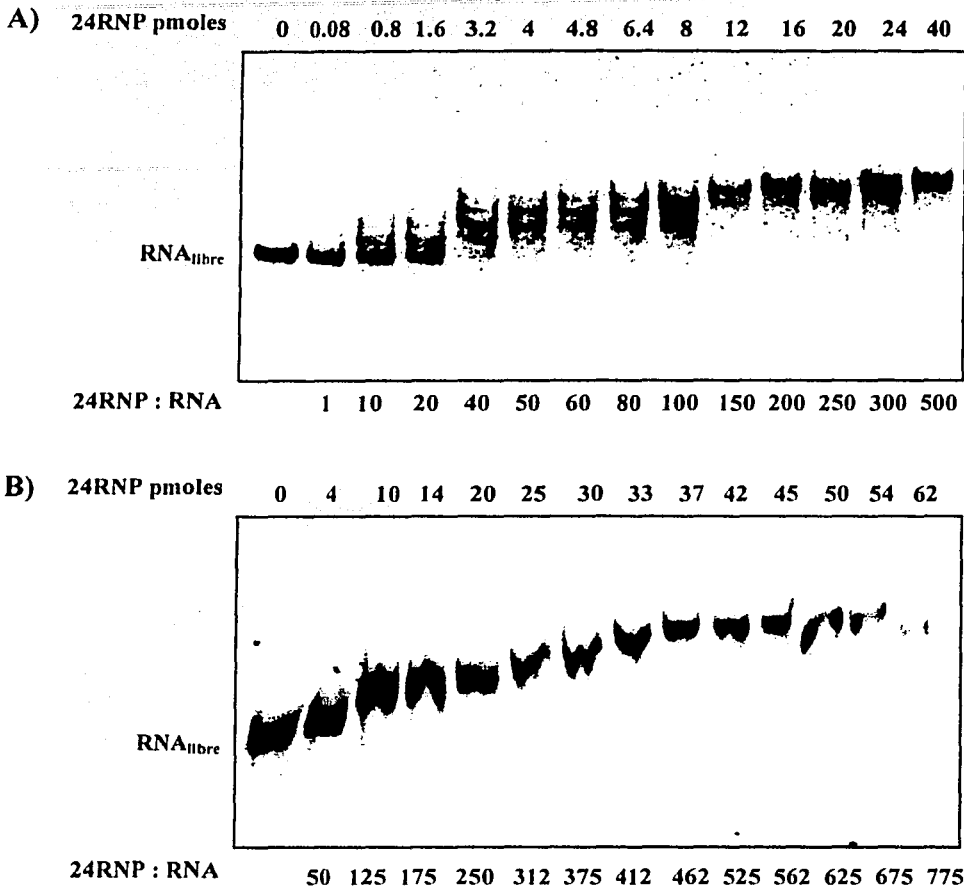
La unión al segmento T-A 3' es cooperativa. Este comportamiento no fue similar al obtenido para *psbA*.

## 6. UNIÓN DE LA 24RNP A LOS EXTREMOS 3'UTRs COMPLETOS, ANALIZADA POR GELES DE RETARDO.

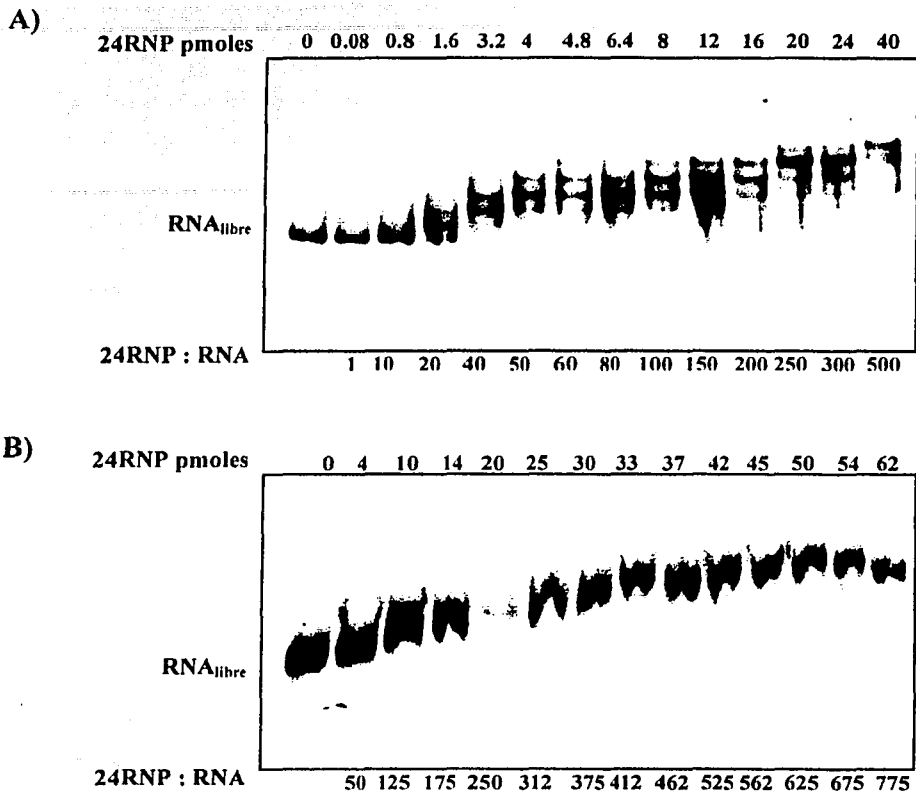
La unión de la 24RNP a los 3'UTRs completos de *psbA* y *petD* también se analizó empleando la técnica de geles de retardo. Para el caso de la unión a *psbA*, se emplearon cantidades de 24RNP de 1 a 500 veces mayores que la del RNA presente en la reacción. Con este ensayo se lograron definir seis complejos para *psbA* y siete complejos de retardo para *petD* (Figuras 21 y 22, panel A). En los ensayos con concentraciones equimolares de 24RNP y de RNA, no se detecta la formación de complejos. La presencia de complejos se comienza a ver cuando cantidades de 24RNP son 10 veces mayores que la del RNA. Con una relación de 40 veces más 24RNP que RNA se logra observar la mayor cantidad de complejos (hasta cinco). En los ensayos con concentraciones mayores de 50 veces más de 24RNP que del RNA, no se observa RNA libre (punto de saturación de RNA). A mayor concentración de proteína, el tamaño de los complejos va aumentando, desapareciendo los de menor tamaño y apareciendo complejos de tamaño mayor. En los ensayos con relaciones de RNA:proteína de 1:500 para *psbA* y de 1: 500 o menores a 800 veces para *petD*, sólo se observa un complejo de gran tamaño (punto de saturación de complejos).

Cuando se realizan los ensayos en las mismas condiciones, aunque en algunos casos con mayores proporciones 24RNP-RNA (50-775 veces), y en presencia de tRNA como competidor (Figuras 21 y 22, panel B), no se logran resolver adecuadamente los complejos observados sin competidor, obteniéndose una sola banda por carril, aunque muy barrida. Sin embargo, la unión de la 24RNP al RNA debe ser semejante a lo que ocurre en el ensayo sin competidor, pues a medida que se analizan mayores concentraciones de 24RNP en el ensayo, se observa un mayor retardo del RNA, lo que indica la formación de complejos de mayor tamaño.

En la Figura 22 se presenta el ensayo de unión al extremo completo de *petD*. En ausencia de competidor se observaron siete diferentes complejos, de forma similar al ensayo con el extremo completo de *psbA* (Figura 21). Cuando el análisis se realizó en presencia de tRNA de levadura como competidor, no se definen los diferentes complejos. Sin embargo, se observa mayor retardo de la migración del RNA conforme aumenta la concentración de 24RNP. Estos resultados indican la unión consecutiva de diferente número de proteínas a las moléculas de RNA.



**Figura 21. Unión de la 24RNP al extremo 3'UTR completo de *psbA*.** A) Diferentes concentraciones de 24RNP (0.08-40 pmoles) se pusieron a interactuar con el extremo completo de *psbA* (80 fmoles) marcado radiactivamente y se analizaron en un gel de retardo. B) Mismo experimento que en A) pero en presencia de tRNA de levadura como competidor. Se utilizaron 18.2 pmoles de competidor (227.5 veces más que el 3'UTR) y 4-62 pmoles de 24RNP. Cada ensayo tiene 8 U de RNasin como inhibidor de RNAsas. En el extremo izquierdo de la figura se indica la concentración de proteína utilizada, la migración del RNA libre y la relación de proteína:RNA ensayada en cada carril.



**Figura 22. Unión de la 24RNP al extremo 3'UTR completo de *petD*.** A) Diferentes concentraciones de 24RNP (0.08-40 pmoles) se pusieron a interactuar con el extremo completo de *petD* (80 fmoles) marcado radiactivamente y se analizaron en un gel de retardo. B) Mismo experimento que en A) pero en presencia de tRNA de levadura como competidor. Se utilizaron 18.2 pmoles de competidor (227.5 veces más que el 3'UTR) y 4-62 pmoles de 24RNP. Cada ensayo tiene 8 U de RNasin como inhibidor de RNAsas. En el extremo izquierdo de la figura se indica la concentración de proteína utilizada, la migración del RNA libre y la relación de Proteína:RNA ensayada en cada carril.

A pesar de que la formación de diferentes complejos en los gels de retardo es indicativa de la unión de varias moléculas de 24RNP, no fue posible obtener información de la estequiometría de unión de la 24RNP con el RNA de los diferentes extremos.

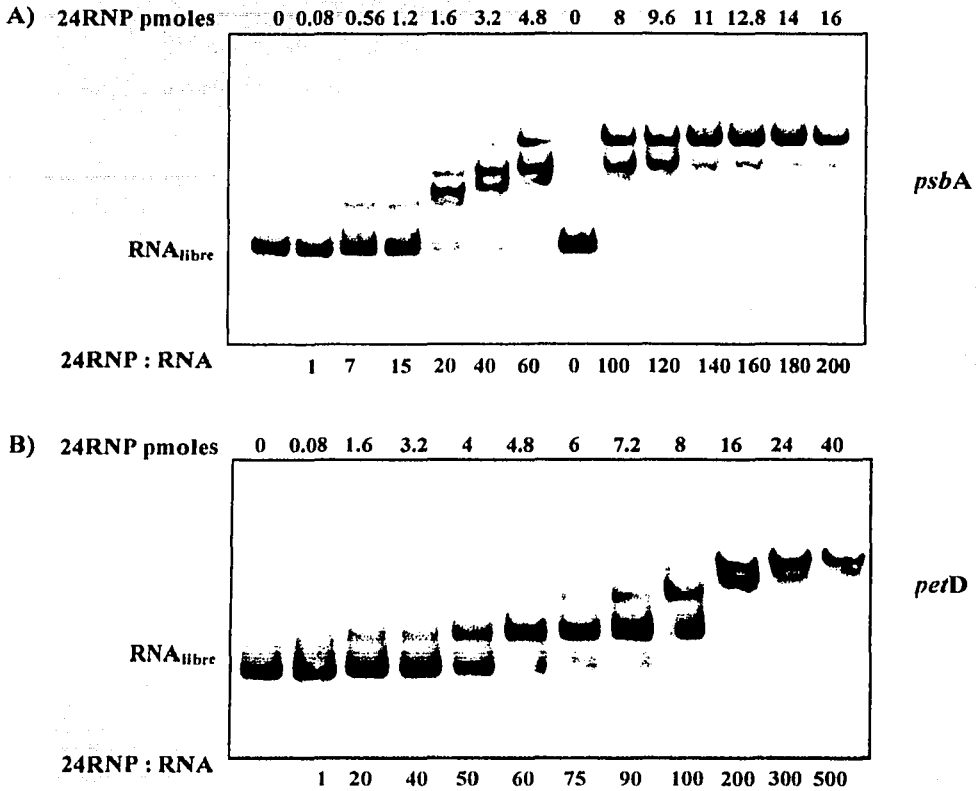
## 7. ANÁLISIS DE LA UNIÓN DE LA 24RNP A LOS DIFERENTES SEGMENTOS DE *psbA* y *petD*, EMPLEANDO GELES DE RETARDO.

Se realizaron ensayos de unión con los diferentes segmentos de los extremos 3'UTR de *psbA* y *petD* de acuerdo al diseño explicado en la Figura 8 y en la Tabla 3. En este caso se empleó la técnica de geles de retardo para su análisis.

### 7.1. Unión de la 24RNP a los segmentos 5' de *psbA* y *petD*.

A continuación se describe la unión de la proteína al segmento 5' (Tabla 3). Para *psbA* se observó la presencia del primer complejo cuando la relación de RNA y proteína fue 1:1. A concentraciones altas de proteína se obtuvieron cuatro diferentes complejos y a concentraciones de 24RNP de 20 veces mayores que del RNA existe poco RNA libre y se mantiene así hasta cuando se llegan a la relación de 140 veces mas 24RNP que RNA (Figura 23 A).

En el ensayo de unión realizado para el extremo 5' de *petD* se observó la presencia del primer complejo desde 80 fmoles de proteína (relación 1:1). A concentraciones altas de proteína también se observaron hasta cuatro diferentes complejos como con el *psbA*. En concentraciones en donde existen 60 veces mas proteína que RNA, casi no hay RNA libre pero desaparece totalmente cuando la relación proteína:RNA es arriba de 100 (Figura 23 B).



**Figura 23. Unión de la 24RNP al segmento 5', analizado por gel de retardo. A)** Diferentes concentraciones de 24RNP (0.08-16 pmoles) se pusieron a interactuar con el segmento 5' de *psA* (80 fmoles) marcado radiativamente y se analizaron en un gel de retardo. **B)** Diferentes concentraciones de 24RNP (0.08-40 pmoles) interaccionaron con el segmento 5' de *petD* (80 fmoles) marcado radiativamente y se analizaron en un gel de retardo. En cada ensayo se utilizó 8 U de RNasin como inhibidor de RNAsas. En el extremo izquierdo de la figura se indica la concentración de proteína utilizada, la migración del RNA libre y la relación de Proteína:RNA ensayada en cada carril.

En la Figura 24 se grafican los datos del ensayo de unión de la 24RNP a *psbA* estudiados por geles de retardo. Esta figura presenta la formación de los diferentes complejos a concentraciones crecientes de 24RNP, así como la disminución rápida del RNA libre a concentraciones bajas de proteína. Este comportamiento se presentó con todos los segmentos en estudio, aunque varió con relación al número de complejos que se formaron, ya que es diferente para cada segmento.

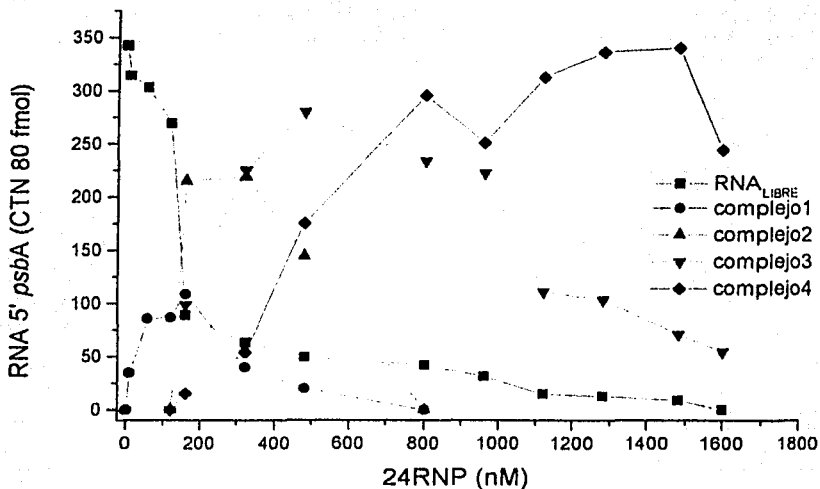


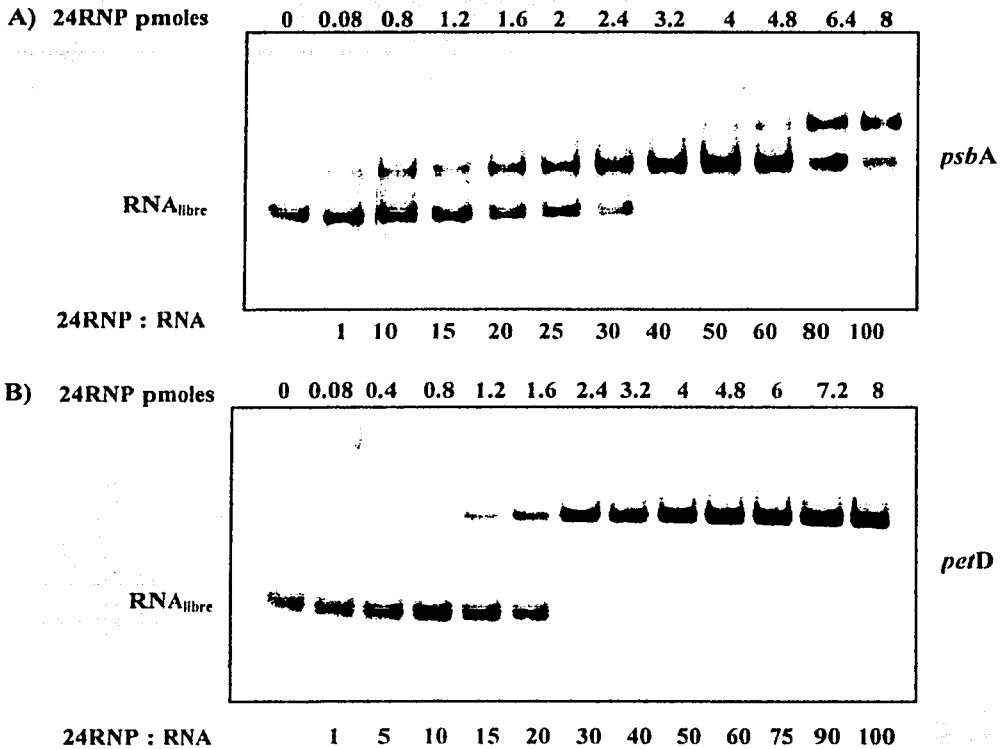
Figura 24. Comportamiento de unión de la 24RNP al 5' de *psbA*, analizado por el ensayo de retardo. En esta gráfica se representa el comportamiento de formación de los complejos y la disminución pronunciada de RNA libre a bajas concentraciones de 24RNP.

## 7.2. Unión de la 24RNP a los segmentos T-A de *psbA* y *petD*.

La unión de la proteína al segmento T-A de *psbA*, se presenta en la Figura 25 A. En este caso, se observó la presencia del primer complejo con 8 nM de proteína (equimolaridad). A concentraciones altas de proteína se formaron dos complejos. Concentraciones superiores a 0.32 nM de 24RNP son suficientes para titular al RNA.

En el ensayo correspondiente al segmento T-A de *petD* se observó la formación de un complejo a partir de 80 fmoles de proteína (ensayo equimolar). Concentraciones de

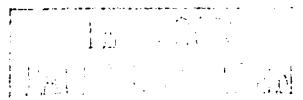
proteína por arriba de 2.4 pmoles son suficientes para titular al RNA (Figura 25 B). A diferencia del estudio con el T-A de *psbA*, con el T-A de *petD* sólo se observó la formación de un complejo.



**Figura 25. Unión de la 24RNP a los segmentos T-A.** A) Diferentes concentraciones de 24RNP (0.08-8 pmoles) fueron puestas a interactuar con el segmento T-A (tallo-asa) de *psbA* (80 fmoles) marcado radiactivamente y analizado por geles de retardo. B) Mismas condiciones que en A) pero empleando el T-A de *petD*.

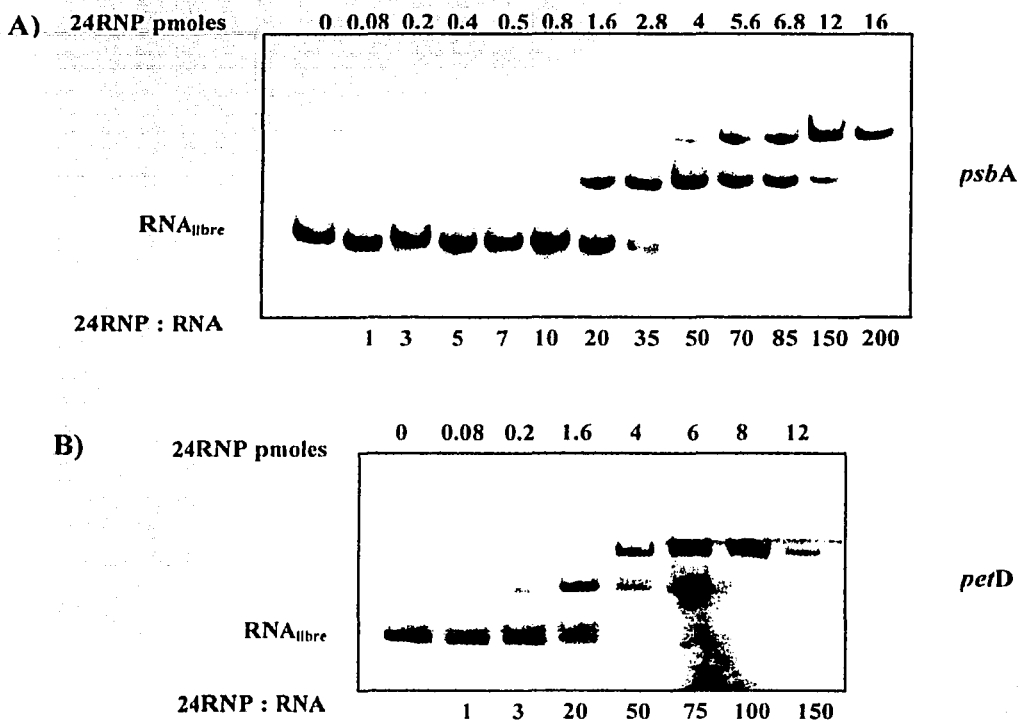
### 7.3. Unión de la 24RNP a los segmentos 3' de *psbA* y *petD*.

En el análisis de la unión de la proteína al segmento 3' de *psbA* se encontró la formación del primer complejo a 500 fmoles de 24RNP. Además, se observaron dos complejos a concentraciones por arriba de 4 pmoles de proteína y esa misma condición es





suficiente para titular al RNA (Figura 26 A). En la unión de la proteína al segmento 3' de *petD* se encontró la presencia del primer complejo a 80 fmoles de 24RNP. Además, se encontraron dos complejos a concentraciones mayores de 4 pmoles de proteína, en donde se tituló el RNA (Figura 26 B).

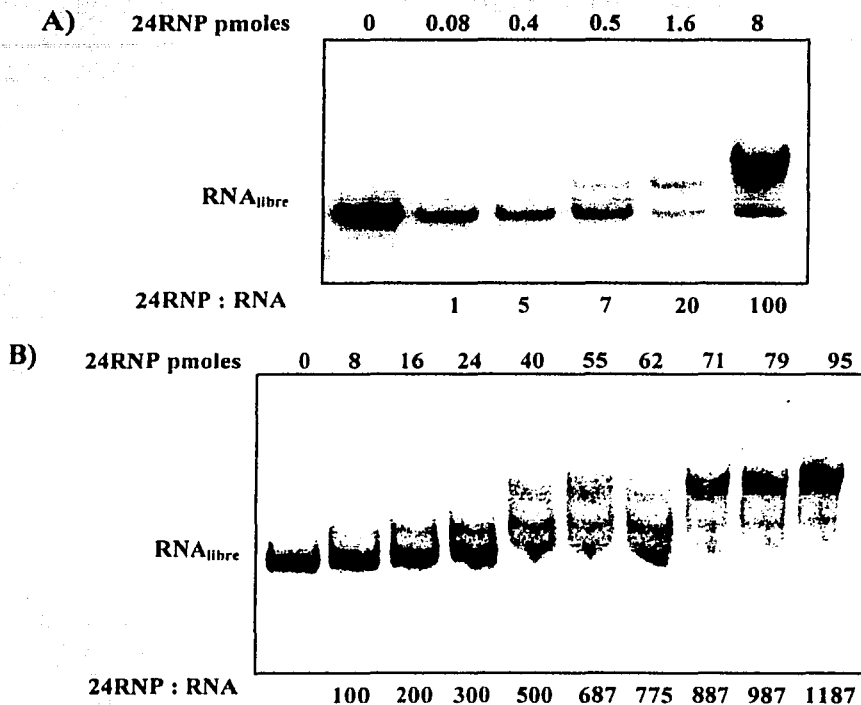


**Figura 26. Unión de la 24RNP al segmento 3'.** A) Diferentes concentraciones de la 24RNP (0.08-16 pmoles) fueron ensayadas con (80 fmoles) del 3' de *psbA* marcado radiactivamente y analizado por gel de retardo. B) Ensayo de la 24RNP (0.08-12 pmoles) con el 3' de *petD* radiactivo (80 fmoles).

#### 7.4. Unión de la 24RNP a los segmentos 5' T-A de *psbA* y *petD*.

Los ensayos de unión de la 24RNP a los segmentos compuestos (5' T-A y T-A 3') se llevaron a cabo con la finalidad observar el comportamiento de unión en segmentos que tuvieran el tallo-asa y otro segmento asociado, ya sea hacia su 5' o hacia su 3'. Estos

ensayos se realizaron en presencia y ausencia de tRNA de levadura como competidor. En la unión de la proteína al segmento 5' T-A de *psbA* se observó la formación de dos complejos. El primer complejo se formó con 500 fmoles de proteína y el segundo complejo a concentraciones mayores a 1.6 pmoles de 24RNP (Figura 27 A).

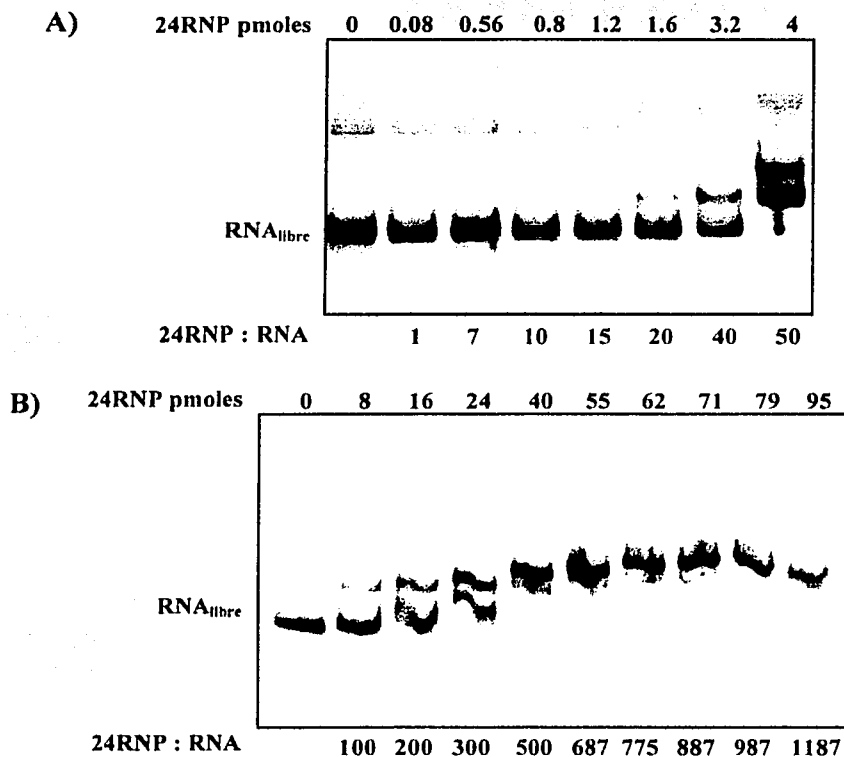


**Figura 27. Unión de la 24RNP al segmento 5' T-A de *psbA*.** A) Diferentes concentraciones de la 24RNP (0.08-8 pmoles) interaccionaron con el 5' T-A de *psbA* (80 fmoles) marcado radiativamente y fueron analizadas por geles de retardo. B) Los mismos ensayos con mayores cantidades de 24RNP (8-95 pmoles) y en presencia de 17.2 pmol de tRNA de levaduras como competidor.

El ensayo de unión en presencia de tRNA como competidor reveló la formación de dos complejos, como lo observado en el ensayo sin competidor, pero estos se formaban con mayor cantidad de proteína (Figura 27 B).

En la unión de la proteína al segmento 5' T-A de *pefD* se observó la formación del primer complejo a 500 fmoles de proteína. Además, se formó un segundo complejo a

cantidades mayores de 1.6 pmoles de proteína. Cuando el ensayo de unión se en presencia de tRNA como competidor, se observó la formación de dos complejos como se encontró en el ensayo sin competidor (Figura 28).

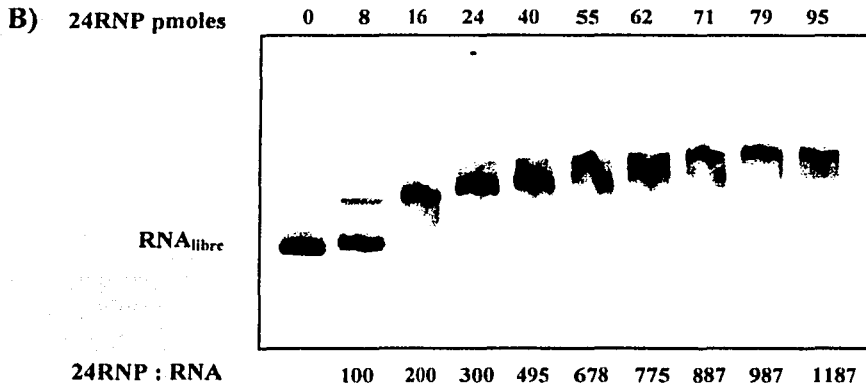
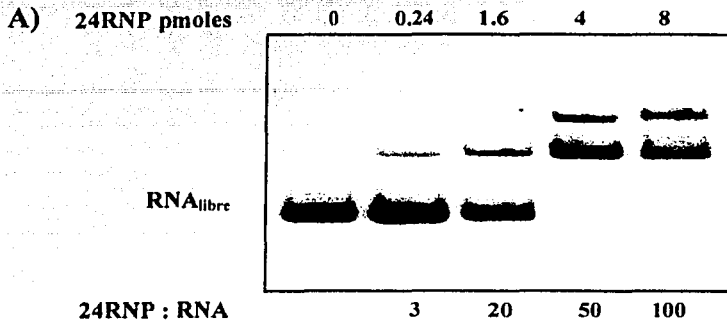


**Figura 28. Unión de la 24RNP al segmento 5' T-A de *petD*.** A) Unión de la 24RNP a diferentes concentraciones con el extremo 5' T-A de *petD*. Se utilizaron 80 fmoles de RNA marcado y 0.08-4 pmoles de proteína. B) Unión con competidor. Se utilizaron 80 fmoles de RNA marcado, 8-95 pmoles de proteína y 17.2 pmol de tRNA.

### 7.5. Unión de la 24RNP a los segmentos T-A 3' de *psbA* y *petD*.

La unión de la proteína al segmento T-A 3' de *psbA* se muestra en la Figura 29 A. La formación del primer complejo aparece a partir de 240 fmoles de proteína. El segundo

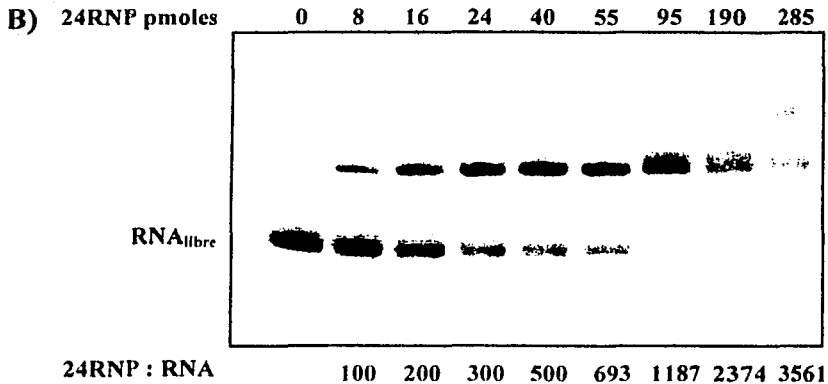
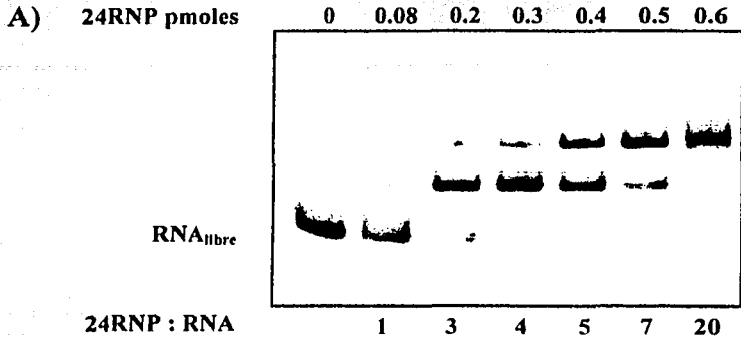
complejo se observó en presencia de concentraciones altas de proteína (4 pmoles). Se ensayó también la unión en presencia de tRNA como competidor, encontrándose básicamente el mismo comportamiento que en el ensayo sin competidor (Figura 29 B).



**Figura 29. Unión de la 24RNP al segmento T-A 3' de *psbA*.** **A)** Diferentes concentraciones de la 24RNP (0.24-8 pmoles) fueron incubadas con el extremo T-A 3' de *psbA* (80 fmoles) marcado radiactivamente y analizadas por geles de retardo. **B)** Mismo experimento que en A pero empleando 8-95 pmoles de proteína y tRNA de levaduras (17.2 pmol) como competidor.

En el ensayo con el segmento T-A 3' de *petD* se observó la formación de dos complejos, el primero se formó con 80 fmoles de proteína, el segundo se encontró a partir

de 200 fmoles de proteína. Se realizó un ensayo con tRNA como competidor encontrándose el mismo comportamiento que en el ensayo sin competidor (Figura 30).



**Figura 30. Unión de la 24RNP al segmento T-A 3' de *petD*.** A) Diferentes concentraciones de 24RNP (0.08-1.6 pmoles) se incubaron con el extremo T-A 3' de *petD* (80 fmoles) marcado radiactivamente y se analizaron por geles de retardo. B) Unión en presencia de tRNA como competidor (17.2 pmol). Se emplearon 8-285 pmoles de proteína.

## 8. ANÁLISIS MATEMÁTICO DE LA UNIÓN DE LA 24RNP A LOS DIFERENTES SEGMENTOS (PROGRAMA DYNAFIT).

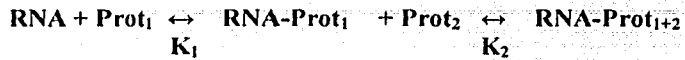
Este programa se utilizó para analizar la unión de la proteína a los diferentes segmentos de los 3'UTRs, utilizando las densitometrias obtenidas en los ensayos de retardo. El lenguaje de programación que utiliza el Dynafit es con base en la creación de archivos de entrada de texto en código ASCII y la utilización del sistema de menú desplegado por el propio programa. Básicamente se utilizan tres tipos de archivos de entrada para cada análisis. En el primer archivo, tipo texto, se capturan los datos experimentales, los cuales se ordenaron en columnas. En nuestro caso fueron la concentración de proteína ensayada y la disminución de la señal de RNA<sub>libre</sub> con base en la señal a 80 fmoles de RNA en la reacción sin proteína (Tabla 6). En el segundo archivo se almacenan diferentes parámetros del análisis a realizar, como el número de iteraciones, intervalo de tolerancia, etc. En el tercer archivo se describe la propuesta del mecanismo de reacción, el número de las constantes, la estimación de los parámetros, etc. En este archivo también se especifica la localización de los archivos de datos anteriormente mencionados y el lugar en donde se almacenarán los archivos de resultados.

*(Prot nM)	(RNAlibre nM)
8	6.7
24	6.5
40	6.6
56	6.4
80	5.7
160	5.15
400	0

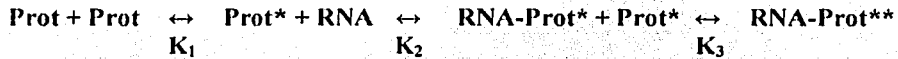
**Tabla 6. Archivo tipo texto.** Ejemplo del archivo creado para los datos de densitometría de la señal obtenida de los geles de retardo.

Para el análisis de los datos obtenidos a partir de los geles de retardo se propusieron dos diferentes modelos. El primer modelo, al cual nombramos de alta afinidad, propone la unión cooperativa de la 24RNP al RNA. Este modelo fue propuesto a partir de la información obtenida en el análisis por X-UV de la interacción de la 24RNP con los

3'UTRs completos (Figura 18 y Díaz-Mireles, 2000) en los cuales se observan curvas de tipo sigmoide que reflejan este tipo de comportamiento, y por la disminución abrupta del RNA libre observada en todos los ensayos y mostrada en la Figura 24. Este modelo supone la unión consecutiva de las proteínas con alta afinidad, al RNA.



El segundo modelo propone la dimerización de la proteína como primer paso y su posterior unión al RNA. Esto se propone debido a la rápida disminución de RNA libre a lo largo de cada ensayo.



En las Figuras 31 y 32 se muestran ejemplos de archivos del tercer tipo creados para los dos modelos propuestos.

```

.\petDRNA1\model3.txt
-----
[task]
  data = equilibria
  task = fit

[mechanism]

  P + R <=> PR : K1  dissoc.
  PR + P <=> PR2 : K2  dissoc.

[constants]
  K1 = 1000?, K2 = 10?,

[concentrations]
  R = 7

[responses]
  P = 0, R = 1?, PR = 0?, PR2 = 0

[equilibria]
  monitor PR, PR2
  directory ./petDRNA1/data
  extension txt
  variable P
  files 3compl

[output]
  directory ./petDRNA1/output

[settings]
  RelTolerance = 1.e-10
  Interrump = 100000

```

Figura 31. Ejemplo de archivo Dynafit para el modelo de alta afinidad. Archivo de entrada de texto ASCII. Este archivo fue utilizado para el segmento 3' de *petD*.

La Figura 32 muestra el archivo creado para el modelo en el que se propone la dimerización como primer paso para su posterior unión con RNA.



```

Script File

.\petDRNA\model3.txt
-----
[task]

  data = equilibria
  task = fit

[mechanism]

  P + P <==> P'      : K1  dissoc.
  P' + R <==> PR     : K2  dissoc.
  PR + P' <==> PR2   : K3  dissoc.

[constants]

  K1 = 10000000, K2 = 1?, K3 = 0.1?

[concentrations]

  R = 7

[responses]

  P = 0, R = 1?, PR = 0?, PR2 = 0

[equilibria]

  directory    ./petDRNA/data
  extension txt
  variable P
  files 3compl

[output]

  directory    ./petDRNA/output

```

Figura 32. Ejemplo de archivo Dynafit para el modelo de dimerización. Archivo de entrada de texto ASCII. Este archivo fue creado para el segmento 3' de *petD*.

Con los datos experimentales compilados, el programa genera una serie de gráficas en donde se presentan los datos ajustados al modelo propuesto y la tendencia de los datos de acuerdo con el análisis de residuales (Figura 33). Esta figura representa las gráficas para el modelo de dimerización. Sin embargo, las gráficas para el modelo de alta afinidad son similares.

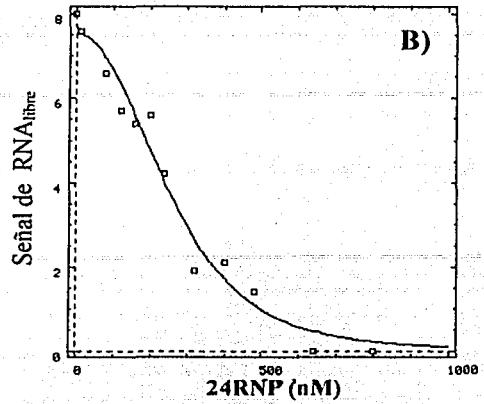
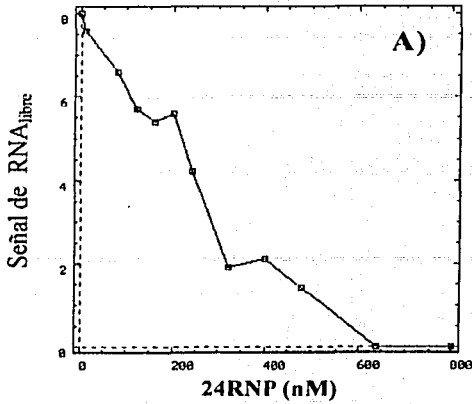
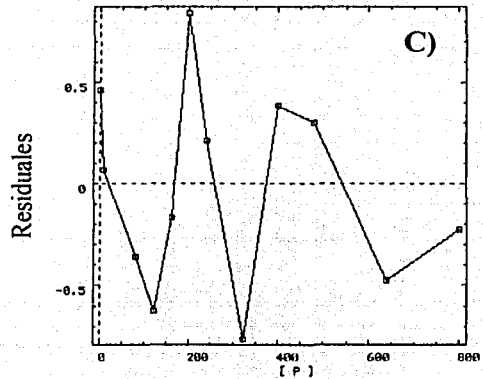


Figura 33. Gráficas obtenidas del análisis del segmento 3' de *psbA* empleando el modelo de dimerización. A) Gráfica de los datos obtenidos en este ensayo. B) Ajuste de los datos a la curva de acuerdo con el modelo propuesto. C) Análisis de la tendencia de los datos por medio de los residuales.



Finalmente se genera una tabla de resultados con los valores de las constantes del modelo (Figura 34). En la columna "parameter" se presentan los parámetros o las constantes que describen el mecanismo propuesto. La columna "initial" muestra los valores iniciales de los parámetros. La columna "fit" presenta el valor de los parámetros ajustados después de que se llevó a cabo el ajuste de los datos del modelo propuesto y la columna "error" y "porciento" en signo, presenta el error estándar y el error en porcentaje respectivamente.






Formal Standard Errors				
Parameter	Initial	Fit	Error	%
$K_1$	1000	743.89	34.75	4.7
$K_2$	10	272.3	34.66	12.7
$\Gamma_R$	1	0.99171	0.01808	1.8
$\Gamma_{PR}$	0	0	0.0190	0.0

Figura 34. Tabla de resultados. Esta tabla de resultados es desplegada por el programa Dynafit. El modelo utilizado fue el de alta afinidad, con el segmento 5' de *petD*.

Con este programa se realizó el ajuste de los resultados de la unión de la 24RNP a los 10 diferentes segmentos de *petD* y *psbA* por geles de retardo.

Para el modelo de alta afinidad los resultados se muestran en la Tabla 7.






Tabla 7. Constantes aparentes obtenidas a partir del modelo de alta afinidad

SEGMENTO	<i>petD</i>		<i>psbA</i>	
	*Kd <sub>1</sub>	*Kd <sub>2</sub>	*Kd <sub>1</sub>	*Kd <sub>2</sub>
5' 	743.9 ± 34.7	272.3 ± 34.66	1189.2 ± 20.2	20.8 ± 11.9
T-A 	1178.9 ± 40.4	30.9 ± 25.8	1158.6 ± 18.6	51.2 ± 14.9
3' 	1178.1 ± 33.2	31.8 ± 25.6	1168.9 ± 20.2	40.9 ± 17.2
5' T-A 	1160.1 ± 44.1	49.8 ± 39.1	734 ± 172.7	546.6 ± 172.7
T-A 3' 	1163.4 ± 36.2	46.6 ± 32.85	1156.5 ± 49.8	53.4 ± 44.5

\*Las constantes aparentes están dadas en valores de nM.

Los resultados de las constantes obtenidas por el modelo de dimerización de la proteína para su posterior unión con el RNA se presentan en la Tabla 8.

**Tabla 8. Constantes aparentes obtenidas a partir del modelo de dimerización**

SEGMENTO	<i>petD</i>		<i>psbA</i>	
	*Kd <sub>2</sub>	*Kd <sub>3</sub>	*Kd <sub>2</sub>	*Kd <sub>3</sub>
5' 	0.0117 ± 0.001	191.6 ± 214	0.00218 ± 0.0007	193.9 ± 778
T-A 	0.0842 ± 0.041	0.00015 ± 8.1e-5	0.0077 ± 0.003	0.0185 ± 0.0222
3' 	21.22 ± 1.9	7.7 e-7 ± 7.05 e-7	0.0086 ± 0.004	0.0068 ± 0.0075
5' T-A 	1.43 ± 39.5	0.0028 ± 0.07	14 ± 4.3	0.0005 ± 0.007
T-A 3' 	0.0094 ± 0.007	0.1 ± 0.1	15.42 ± 3.5	4.7 e-8 ± 7.2 e-8

\*Las constantes aparentes están dadas en valores de nM.

El valor asignado de K<sub>d1</sub> para el modelo de dimerización fue de 1 x 10<sup>7</sup>. Este es un valor propuesto para la afinidad entre la proteína.

Las constantes K<sub>d1</sub> obtenidas ajustando los datos al mecanismo de alta afinidad (Tabla 7) son muy parecidas entre sí. La proteína tiene mayor afinidad por el segmento 5' de *petD* y 5' T-A de *psbA*. Las K<sub>2</sub> fueron más pequeñas que las K<sub>1</sub>, indicando mayor afinidad después de la primera unión. Las K<sub>2</sub> de los segmentos 5' y 5' T-A de *petD* y *psbA* respectivamente fueron menores que las K<sub>2</sub> de los otros segmentos.

El valor de las constantes aparentes obtenidas para este mecanismo de alta afinidad (μM) es similar al de las K<sub>0,5</sub> obtenidas por la técnica de X-UV (Tablas 4 y 5).

El valor de las K<sub>2</sub> para el mecanismo de dimerización de la proteína antes de su unión al RNA (Tabla 8) mostraron que el dímero tiene mayor afinidad por los segmentos 5' y T-A 3' de *petD* y por los segmentos sencillos de *psbA*, siendo más afin por el 5' y posteriormente por el T-A y 3'. La tendencia de las constantes K<sub>2</sub> no fue consistente con las obtenidas para el modelo de alta afinidad. El valor de las K<sub>3</sub> indican una interacción proteína-RNA con una menor afinidad que las que describen las K<sub>2</sub>. Sin embargo, las desviaciones estándar, así como el error estándar es muy alto. El valor de las constantes para este modelo varía del orden pM-nM.

# DISCUSIÓN

## 1. LA 24RNP RECOMBINANTE SE UNE A LOS 3'UTRs DE *psbA* Y *petD* *in vitro*.

La utilización de plásmidos pQE para la expresión de proteínas recombinantes es de gran utilidad, ya que la purificación de éstas se facilita por la etiqueta de 6 histidinas con la que queda marcada. Por otro lado, ya en varios trabajos se han utilizado con éxito proteínas de unión a RNA producidas en sistemas recombinantes (Lisitsky *et al.*, 1994; DeMaria *et al.*, 1996). La proteína recombinante 24RNP se obtuvo de la cepa de *E. coli* M15, la cual se había transformado previamente con el plásmido pQE24RNP (Toledo, 1998) que contenía el gen de la 24RNP de espinaca, sin el péptido de tránsito, produciendo así la proteína madura tal y como se encuentra en el cloroplasto. Esta proteína recombinante se utilizó en los experimentos de unión a los extremos 3'UTRs completos o a los segmentos de los genes *psbA* y *petD*. En los experimentos control se determinó la unión de la 24RNP recombinante con los 3'UTRs, tanto por X-UV (Figura 12) como por geles de retardo (Figura 13). Los resultados mostraron que la 24RNP recombinante fue capaz de unirse tanto a *psbA* y a *petD*, aún en presencia de concentraciones altas de BSA, la cual tiene la característica de ser "cohesiva". Estos resultados indicaron que la 24RNP recombinante mantiene su capacidad de unir RNA, lo que sugiere que muy probablemente debe estar plegada en su conformación nativa. Además, se comprobó que la presencia de la etiqueta de histidinas en la 24RNP recombinante no participa en la unión al RNA, puesto que la proteína recombinante N433CTCF, la cual contiene dos etiquetas de histidinas, no fue capaz de unirse al RNA en los ensayos de X-UV.

## 2. LAS ESTRUCTURAS SECUNDARIAS DEL RNA INFLUYEN EN LA UNIÓN DE LA 24RNP A LOS 3'UTRs DE MENSAJEROS CLOROPLÁSTICOS.

La unión específica de algunas proteínas al RNA está determinada por la presencia de ciertas secuencias y estructuras secundarias (Battle *et al.*, 2001; Addes *et al.*, 1997). Esto ha sido estudiado ampliamente en mensajes regulados por hierro, como el de la ferritina y la transferrina, los cuales presentan estructuras tallo-asa (IRE) a las cuales se les

unen factores proteicos específicos (IRBP) que regulan su estabilidad o disponibilidad para la traducción (Henderson *et al.*, 1996; Hades *et al.*, 1997). Dado que uno de los objetivos de este trabajo fue determinar si la unión de la 24RNP era estructura o secuencia específica, se decidió abordar la primera posibilidad. Con este propósito se modelaron teóricamente las estructuras secundarias de las secuencias de los 3'UTRs transcritas *in vitro* ([www.bioinfo.rpi.edu/zukerm/rna/](http://www.bioinfo.rpi.edu/zukerm/rna/)). El análisis mostró las estructuras presentes en los RNAs, plegadas en su conformación más estable, con los tallo-asa, asas y burbujas de las moléculas (anexos 2 y 3). En un trabajo realizado por Stern y Gruissem (1991) se publicó el mapeo de los 3'UTRs de *petD* y *psbA* empleando RNAsas que reconocen específicamente la doble cadena o la cadena sencilla, lo cual permitió determinar la presencia de tallos o asas en las moléculas. Las estructuras secundarias presentadas por el análisis teórico concuerdan con el mapeo con RNAsas. Estos resultados permiten suponer que los plegamientos teóricos obtenidos pueden presentarse en los 3'UTRs en solución (Figura 14).

Además, fue necesario determinar la temperatura a la cual las estructuras secundarias presentes en el RNA en solución se desnaturalizarían. Para tal fin, se realizó un análisis teórico de estas secuencias a diferentes temperaturas, en el sitio [www.bioinfo.rpi.edu/zukerm/rna/](http://www.bioinfo.rpi.edu/zukerm/rna/). Así, se observó que a 85°C todas las estructuras secundarias se perdían con excepción de un tallo-asa (Figura 15). Esta estructura tallo-asa está presente en casi todos los 3'UTRs de cloroplasto y es la de mayor estabilidad debido a su  $\Delta G$  negativo alto. Está formada por una secuencia invertida repetida (IR) que señala el extremo 3' del mensaje maduro, el cual se produce por procesamiento postranscripcional que involucra la actividad de endo y exo-nucleasas (Hayes *et al.*, 1996). Con esta información se diseñaron ensayos de X-UV con la 24RNP y los 3'UTRs desnaturalizados por calor a 85 °C y enfriados a 4 °C, temperatura a la cual la re-naturalización del RNA es baja; todos los ensayos se llevaron a cabo a 4°C. En los ensayos incluidos en la tesis y algunos no mostrados, la tendencia de unión de la 24RNP, disminuye con el RNA desnaturalizado (Figura 16). Sin embargo, esta tendencia no fue estadísticamente significativa.

Los ensayos de unión proteína-RNA en presencia de tRNA como competidor son una estrategia que frecuentemente se utiliza para conocer la especificidad de una proteína por su RNA blanco (Ossenbühl *et al.*, 2002). En este trabajo realizamos este tipo de

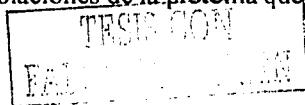
ensayos empleando de 1 a 20,000 veces más tRNA de levadura que el 3'UTR blanco (Figura 17), encontrándose que solamente cantidades tan altas como 20,000 veces más de tRNA pudieron desplazar la unión de la 24RNP por los 3'UTRs de *petD* y *psbA*. Con estos resultados se comprobó que la 24RNP se une al *petD* y al *psbA* de manera específica, ya que la presencia de moléculas como el tRNA de levadura no impiden su unión a los 3'UTRs de mensajeros cloroplásticos.

Con base en estos datos, proponemos que la unión de la 24RNP ocurre en estructuras secundarias diferentes a las presentes en el tRNA de levadura puesto, que éste no inhibe la unión al RNA blanco. Los puntos que apoyan estas propuestas son: a) no hay similitud en las secuencias de los 3'UTRs de *psbA* y *petD*, b) la estructura tallo-asa con alto  $\Delta G$  negativo es común a las dos moléculas de RNA estudiadas, aunque con topologías diferentes y c) que la 24RNP no se une a cualquier molécula de RNA, aún con alto grado de estructura secundaria.

### **3. LA 24RNP SE UNE DE MANERA COOPERATIVA AL EXTREMO COMPLETO 3'UTR DE *psbA*.**

Se han realizado varios estudios de caracterización de RNPs en los cloroplastos de tabaco y espinaca (Nakamura *et al.*, 2001; Stern *et al.*, 1989). La proteína más estudiada es la 28RNP. Esta proteína fue la primera a la que se le asignó una función reguladora en el procesamiento y la maduración de los mensajeros cloroplásticos de acuerdo con los ensayos de procesamiento *in vitro*. La 28RNP se identificó en el cloroplasto de espinaca y pertenece al grupo llamado RNPs de tamaño pequeño, al cual también pertenece la 24RNP. En estudios en los cuales concentraciones constantes de 28RNP y concentraciones variables de diferentes 3'UTRs, entre ellos *petD* y *psbA* empleando X-UV, se observaron cinéticas de unión hiperbólicas, con valores de Kd de 0.5 y 0.3 nM respectivamente (Lisitsky *et al.*, 1995b). En este trabajo, se empleó la misma técnica para caracterizar la unión de la 24RNP con el extremo 3'UTR de *psbA*. Se encontró que la unión se comportaba como una doble sigmoide, representada matemáticamente por una doble ecuación de Hill (Figura 18).

Estos resultados indican que la unión de la proteína presenta cooperatividad en dos componentes de diferente afinidad, el primero con mayor afinidad que el segundo. Este resultado tiene varias explicaciones a) que hay dos poblaciones de la proteína que se unen



con diferente afinidad al RNA y b) que la proteína se une primero al RNA en sitios de alta afinidad de manera cooperativa, pero que en condiciones de alta concentración de proteína estos sitios ya están ocupados y entonces se une a otros sitios con menor afinidad, pero también de manera cooperativa. La primera posibilidad es difícil de sostener dado que la proteína se produce de manera recombinante en *E. coli* y se purifica por medio de su etiqueta de histidinas a un 90% de pureza; además, se desfosforilada por un tratamiento con fosfatasa para evitar que una posible fosforilación realizada por la bacteria afecte la unión con el RNA. Esto último se realizó debido a que en nuestro laboratorio hemos encontrado que la proteína fosforilada une los 3'UTRs con mayor afinidad que la no fosforilada (Vargas-Suárez comunicación personal).

El comportamiento cooperativo en la unión con *psbA* es semejante a lo observado por Días Mireles (2000) con el extremo 3'UTR de *petD* (anexo 1).

#### **4. POR ANALISIS DE X-UV LA 24RNP SE UNE CON MAYOR AFINIDAD AL SEGMENTO 3', DESPUÉS DEL TALLO-ASA.**

Para determinar con más detalle el o los sitios de unión de la 24RNP a los 3'UTRs de *petD* y *psbA* se decidió seccionar estos extremos en segmentos más pequeños que comprendieran distintas partes estructurales. Así, los extremos 3' UTRs de los dos genes se seccionaron en tres segmentos simples: la secuencia 5' antes del tallo-asa (5'); la secuencia tallo-asa (T-A) y la secuencia posterior al tallo-asa (3') y dos segmentos compuestos: la secuencia 5' más el T-A (5' T-A) y la secuencia T-A más el 3' (T-A 3') (Figura 11a y 11b). Estos segmentos se utilizaron para realizar ensayos de unión con X-UV empleando cantidades constantes de los transcritos y cantidades variables de la 24RNP. Los resultados mostraron que la 24RNP es capaz de unirse a lo largo de todo el extremo 3'UTR, puesto que se unió a todos los segmentos probados para los dos genes (Figuras 19 y 20). Para conocer los parámetros de unión,  $K_{0.5}$  aparente y unión máxima ( $B_{máx}$ ) para cada segmento, los resultados se analizaron de manera no lineal con el programa Origin 5.0. Para los segmentos seccionados de *psbA* (Tabla 4) se observó mayor afinidad por el segmento 3' ( $0.41 \pm 0.007 \mu\text{M}$ ) posteriormente por el segmento T-A ( $0.94 \pm 0.3 \mu\text{M}$ ), luego por los segmentos compuestos que presentan el tallo-asa con el 5' o con el 3' ( $1.29 \pm 0.6$  y  $1.63 \pm 0.7 \mu\text{M}$  respectivamente) y finalmente por el 5' ( $2.45 \pm 0.5 \mu\text{M}$ ). El segmento



5' presentó un comportamiento cooperativo, tanto en su forma sencilla como asociado al tallo-asa 5' T-A, presentando números de Hill de 2 y 4 respectivamente.

Para los segmentos de *petD* las afinidades fueron las siguientes: la mayor afinidad fue por el segmento 3' ( $0.41 \pm 0.1 \mu\text{M}$ ), después por el T-A 3' ( $1.29 \pm 0.4 \mu\text{M}$ ), posteriormente, con una afinidad muy parecida, por los segmentos T-A y 3' ( $1.94 \pm 0.4$ ;  $1.87 \pm 0.6 \mu\text{M}$ , respectivamente) y la menor afinidad fue por el segmento 5' T-A ( $4.38 \pm 1.5 \mu\text{M}$ ). El único análisis que reveló comportamiento cooperativo fue para el T-A 3', con número de Hill cercano a 5. Estos resultados podrían indicar que en los extremos 3' de ambos mensajes existen elementos que le confieren mayor afinidad, indicando quizá una preferencia funcional por este extremo, ya que esta secuencia es procesada durante la maduración de los RNAs. Estos resultados también indican que el tamaño del segmento no es determinante para su unión, ya que este segmento representa el 30% con respecto al extremo completo en ambos mensajes.

## **5. POR ANALISIS DE GELES DE RETARDO, LA 24RNP FORMA MULTIPLES COMPLEJOS CON LOS SEGMENTOS DE *psbA* Y *petD*.**

Otra forma de estudiar la interacción proteína-RNA es por la técnica de geles de retardo, en donde se permiten las uniones de estas moléculas y luego se analizan por electroforesis en un sistema nativo (DeMaria *et al.*, 1996; Mukherjee *et al.*, 2002). La técnica permite determinar la interacción proteína-RNA por un retardo en el corrimiento del RNA radiactivo en comparación con el RNA libre. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada en la identificación y determinación de la afinidad y especificidad de factores de transcripción por regiones de DNA, aunque el empleo de esta técnica para el estudio de interacciones proteína-RNA no ha sido muy amplio debido a las complejidades de este sistema. Sin embargo, la ventaja de esta técnica es que permite la cuantificación de RNA libre para utilizarla en el cálculo de las Kds, así como para determinar si la interacción es por la formación de uno o varios complejos, lo cual no es posible utilizando la técnica de X-UV.

La unión de la 24RNP a los 3' UTRs completos de *psbA* y *petD*, a concentraciones variables de proteína y constantes de RNA, muestra la formación de seis complejos diferentes para *psbA* y siete para *petD*. La aparición de más de un complejo ocurre en cantidades de 10 a 20 veces más proteína que RNA. A mayor concentración de proteína, el

tamaño de los complejos va aumentando, desapareciendo los de menor tamaño y apareciendo complejos de tamaño mayor, hasta llegar a una concentración en la que solamente aparece un complejo de tamaño alto, condición que denominamos saturación de complejos. Esta dinámica de saturación puede explicarse por la unión de la proteína a sitios en el RNA, formando complejos con pocas moléculas de proteína a concentraciones bajas y posteriormente, por la unión sucesiva de otras moléculas de proteína a estos mismos complejos, aumentando el tamaño de los mismos. Sin embargo, con estos experimentos no es posible saber si la unión de proteínas sucesivas ocurre sobre las moléculas de RNA o si la 24RNP interactúan consigo misma. La primera opción implicaría que la proteína se une a lo largo de todo el RNA indistintamente y en el caso de la segunda opción, que solamente se une a sitios específicos en la molécula de RNA y que por interacción proteína-proteína, se adicionan más moléculas de proteínas al complejo.

Por otra parte, de acuerdo con estas observaciones, se pueden distinguir dos puntos interesantes en este fenómeno: la saturación del RNA, es decir, cuando ya no queda RNA libre y existe la formación de uno o varios complejos, y la saturación de complejos, que es cuando existe un complejo de alto peso molecular y desaparecen los complejos de menor tamaño. Estos dos puntos reflejan dos fenómenos diferentes. En la saturación del RNA todas las moléculas de RNA están unidas proteínas, ya sea formando complejos del menor tamaño (primer complejo) o de tamaño intermedio (segundo o tercer complejos). Esto ocurre a concentraciones alrededor de 40 veces más proteína que RNA. La idea de 40 moléculas de proteína de 24kDa, unidas a una molécula de RNA de 79 y 109 kDa (*petD* y *psbA* respectivamente) es poco probable desde un punto de vista biológico. En este sentido proponemos que este resultado debe ser considerado a la luz de las limitaciones de la técnica utilizada. Así, habrá que considerar primero, si realmente la unión de la proteína pura es la forma biológica de unión, es decir, si la proteína no requiere de alguna modificación postraducciona l o de la interacción con otras proteínas para unirse más eficientemente al RNA. Segundo, si las condiciones experimentales de concentraciones de amortiguadores, pH u otros componentes de la mezcla de reacción son las adecuadas para que ocurra la unión eficientemente, ya que se sabe que la unión de las proteínas nativas de 28 y 24 kDa a RNA está influida por iones divalentes como el  $Mg^{2+}$  y el  $Mn^{2+}$  (Stern, *et al.*, 1989c). Tercero, el equilibrio establecido *in vitro*, a concentraciones bajas de proteína se afecta mas por la modificación del equilibrio durante la electroforesis (Cann, 1996).

El punto de saturación de los complejos lo consideramos como la concentración de proteína que es capaz de llenar todos los sitios de unión presentes en la molécula. Los valores correspondientes a este punto son de 500 veces más proteína que RNA, lo cual es también un valor extraordinariamente alto. En este sentido, los argumentos expuestos en el párrafo anterior deben ser considerados para el análisis de este valor. Por otro lado, se puede especular acerca de la factibilidad biológica de este fenómeno, es decir, de si realmente ocurrirá *in vivo* la ocupación de todos los posibles sitios de unión del RNA por esta proteína. Independientemente de que este fenómeno pudiera no ocurrir *in vivo*, los resultados reflejan una propiedad de la 24RNP.

En los ensayos en los que se empleó tRNA como competidor, los complejos no pudieron resolverse, aunque la unión sucesiva de más moléculas de 24RNP al RNA puede deducirse del mayor retardo observado (Figuras 21 B y 22 B). Aunque se emplearon cantidades totales de proteína más altas en los ensayos con competidor, la saturación del RNA considerada como el no aumento en el retardo de la migración del RNA, se observó con concentraciones semejantes a las observadas en el experimento sin competidor (462 veces más proteína que RNA).

Debido al diseño del experimento, en donde sólo el RNA se encontraba marcado con  $^{32}\text{P}$ , así como a una limitante de la propia técnica, no fue posible determinar la estequiometría en cada complejo encontrado. En el trabajo de Carey, 1988, la presencia de diferentes tamaños de complejos en altas concentraciones de proteína (120-800nM) determinaron la presencia de 2-17 subunidades de proteínas en los complejos presentes.

Con base en estos resultados se propone que la 24RNP se une al RNA en diferentes sitios, siendo una proteína de unión múltiple no específica de secuencia. Para determinar si existía preferencia de la 24RNP por alguna región de RNA se utilizó la misma estrategia que empleamos para el análisis por X-UV, con el fin de revisar la unión de la proteína a diferentes segmentos del 3'UTR.

## **6. FORMACIÓN DE DIFERENTES COMPLEJOS EN LA UNIÓN A LOS SEGMENTOS DE *psbA* Y *petD* POR GELES DE RETARDO.**

Con base en la formación de diferente número de complejos, del tamaño y la complejidad de los segmentos, podemos agrupar los resultados de la siguiente manera:

Grupo TA. Contiene los tallos-asa de *petD* y de *psbA*, constituidos por secuencias de 47 y 59 nt y tamaños de 15.8 y 21.6 kD respectivamente, que presentan la formación de uno y dos complejos respectivamente. La formación del primer complejo se observó con concentraciones de 24RNP de 80 nM lo cual corresponde a una relación proteína:RNA de 1:1. La saturación del RNA es observada en relaciones 30:1 para *psbA* y 20:1 para *petD*.

Grupo 3' de *petD* y *psbA* con secuencias de 61 y 94 nt y tamaños de 20.5 y 34.4 kD respectivamente, presentaron la formación de dos complejos. La formación del primer complejo se observó con una relación de 7:1 para *psbA* y 1:1 para *petD*. La saturación del RNA se observó por arriba de una relación de 50 veces más proteína que de RNA.

Grupo 5' de *petD* y *psbA* con secuencias de 108 y 145 nt y tamaños de 36.32 y 53.1 kD respectivamente, presentaron la formación de cuatro complejos. La formación del primer complejo se observó con concentraciones de 24RNP de 8 nM lo cual corresponde a una relación proteína:RNA de 1:1. La saturación de RNA ocurrió a relaciones arriba de 100:1 prot:RNA.

Grupo TA 3' y 5' TA de 108 y 153 nt y 154 y 204 nt para *petD* y *psbA* respectivamente y con tamaños correspondientes de 36.3, 56, 51.7 y 74.7 kD. Para este grupo los experimentos no fueron estudiados a las concentraciones requeridas para lograr el punto de saturación de complejos por lo cual no podemos determinar el número máximo de complejos que se pueden formar. Los resultados mostraron dos complejos en todos los casos, aunque por los resultados de los estudios con competidor parecería que podrían haberse formado tres o cuatro complejos. 5' TA *psbA* 7:1, *petD* 10:1; TA3' *psbA* 3:1 y *petD* 1:1.

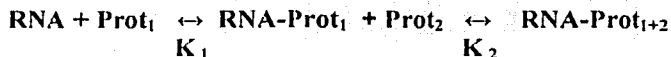
Este análisis permite proponer que la unión de la 24RNP no es específica de un segmento, como ya había sido observado por X-UV. La formación de diferentes complejos parece depender tanto de la complejidad de la estructura como de la longitud del segmento analizado. Sin embargo, no se puede concluir que a mayor complejidad de estructura secundaria y mayor longitud, la unión va a ser mayor, puesto que en algunos casos, segmentos con mucha complejidad estructural y mayor longitud, forman el mismo número de complejos que estructuras más pequeñas y de menor complejidad i.e. el grupo 3' en el que ambos segmentos forman dos complejos.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 7. CÁLCULO DE LAS CONSTANTES CINÉTICAS POR ANÁLISIS MATEMÁTICO.

El análisis de las constantes en los ensayos por geles de retardo, se realizó utilizando el programa de cómputo Dynafit. Se propusieron dos tipos de equilibrios para describir la unión de la 24RNP con los diferentes RNAs utilizados. Es importante resaltar una limitante de la técnica de geles de retardo: durante las reacciones de unión se espera que el sistema llegue a un equilibrio, pero éste se modifica durante la electroforesis, por lo que las entidades más “ligeras” (proteína y RNA) migran más rápido que los complejos; esto implica que el equilibrio se desplaza hacia los reactantes (Cann, 1996). Por lo tanto esta técnica subestima la cantidad de complejo formado, pero la señal del RNA libre se puede utilizar para determinar las constantes de disociación aparentes, ya que las moléculas de RNA que se disocian durante la electroforesis no alcanzan a las moléculas de RNA que quedaron libres en el equilibrio (Carey, 1989).

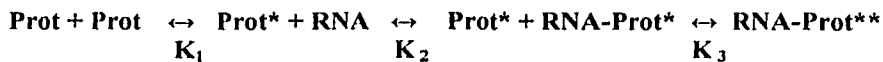
El primer análisis se realizó suponiendo una alta afinidad de la proteína por el RNA y una unión con cooperatividad.



Las afinidades obtenidas para los segmentos sencillos de *psbA* fueron similares, para el 5', T-A y 3' (Kd=1189.2, 1158.6 y 1168.9 nM respectivamente). Para el gen de *petD*, la afinidad fue mayor por el segmento 5' (Kd=743 nM) y afinidad similares por los segmentos T-A y 3' (Kd=1178.9 y 1178.1 nM respectivamente).

Las afinidades por los segmentos compuestos de *petD* mostraron afinidades similares (5' T-A Kd=1160.7 nM y T-A 3' Kd=1163.4 nM). Los segmentos compuestos de *psbA*, la proteína presentó menor afinidad por el T-A 3' Kd=1156.5 nM que por el segmento 5' T-A 734 nM.

En el segundo análisis, se consideró la posibilidad de una interacción proteína-proteína antes de unirse al RNA. El equilibrio propuesto fue el siguiente:



Los resultados mostraron que la proteína presenta menor afinidad por los segmentos 3' y 5' T-A ( $K_d = 21.2$  y  $1.43$  nM), que por los segmentos T-A, 5' y T-A 3' ( $K_d = 84.2$ ,  $11.7$  y  $9.4$  pM respectivamente) de *pefD*. La menor afinidad presentada por la 24RNP fue para los segmentos de *psbA* fue para 5' T-A y T-A 3' ( $K_d = 14$  y  $15.42$  nM respectivamente). Estos resultados fueron consistentes solo para el segmento 5' T-A. La afinidad fue mayor para los segmentos 3', T-A y 5' ( $8.6$ ,  $7.7$  y  $0.7$  pM).

Para decidir entre los dos modelos se deben realizar otros ensayos. Por ejemplo, se podrían realizar experimentos de sedimentación al equilibrio, para conocer si la 24RNP presenta un equilibrio dímero-monómero. En cuanto a los valores de  $K_d$ , parecen ser que las obtenidas con el primer modelo (alta afinidad), concuerdan con los datos obtenidos por el método de X-UV. Se ha reportado que las afinidades de las proteínas de unión a secuencias específicas, como es el caso de las SLBPs (stem-loop binding proteins), son del orden de  $0.85$ - $1.5$  nM (Battle *et al.*, 2001). En el caso de IRP1 (proteína de unión a elementos que responde a hierro IREs) las constantes aparentes de unión son del orden de  $44$ - $114$  pM.

## 8. POSIBLE MECANISMO DE UNIÓN DE LA 24RNP A LOS 3'UTRs DE MENSAJEROS CLOROPLÁSTICOS.

Al realizar los ensayos en condiciones nativas se tiene la ventaja de estudiar los procesos en el estado que participan las moléculas en condiciones que son lo más parecidas a su interacción natural. Este método permitió observar diferentes complejos proteína-RNA. Sin embargo, la separación electroforética modifica el equilibrio de estas interacciones, por lo que los resultados son una aproximación de la interacción original.

Por otro lado el análisis por X-UV, tiene la ventaja de que la interacción proteína-RNA se mantenga por medio de la formación de enlaces covalentes por la acción de la luz ultravioleta. Sin embargo, la posible presencia de interacciones proteína-proteína no se detectan con este método. Dado lo anterior, consideramos que estos métodos proporcionan información complementaria, proponiendo el siguiente mecanismo de interacción entre la 24RNP y los 3'UTRs.

Existen sitios tipo "hot spots" en la zona del 3', adyacente al tallo-asa, principalmente en donde se observó una mayor afinidad por la proteína. Los cuales pueden ser los primeros en ocuparse, con la posterior unión a las demás zonas de los extremos

3'UTRs. La zona del 3' es la que se pierde durante el procesamiento de los mensajes *in vivo*; por lo que podría ser muy importante la unión de esta proteína en esta zona, dado que en ensayos de transcripción *in vitro* esta proteína pareciera tener funciones de estabilidad del mensaje y/o de ayudar a indicar el sitio de procesamiento de los 3'UTRs.

TESIS CON  
FALLA DE ORDEN

## CONCLUSIONES

- La 24RNP es una proteína que se une a lo largo del 3'UTRs de los mensajes de *pelD* y *psbA*. La unión de esta proteína no es secuencia específica.

-La formación de los complejos parece depender tanto de la complejidad de la estructura como de la longitud del segmento.

- Las dos técnicas utilizadas para el cálculo de las constantes de equilibrio no mostraron resultados de afinidades similares entre sí.

Las constantes de afinidad obtenidos por X-UV, mostraron que la proteína tiene mayor afinidad por los extremos 3' de los dos 3'UTRs.

La técnica de gel de retardo mostró que la 24RNP puede formar diferentes complejos con los RNAs. Estas técnicas dieron información deferente acerca de la interacción entre proteínas y proteína(s)-RNA.



## PERSPECTIVAS DEL PROYECTO

-Con el fin de reforzar la idea de que la unión de la proteína es estructura secundaria dependiente, podría ser importante realizar ensayos de unión con otro tipo de 3'UTRs, como mensajes citoplásmicos de plantas o de bacterias.

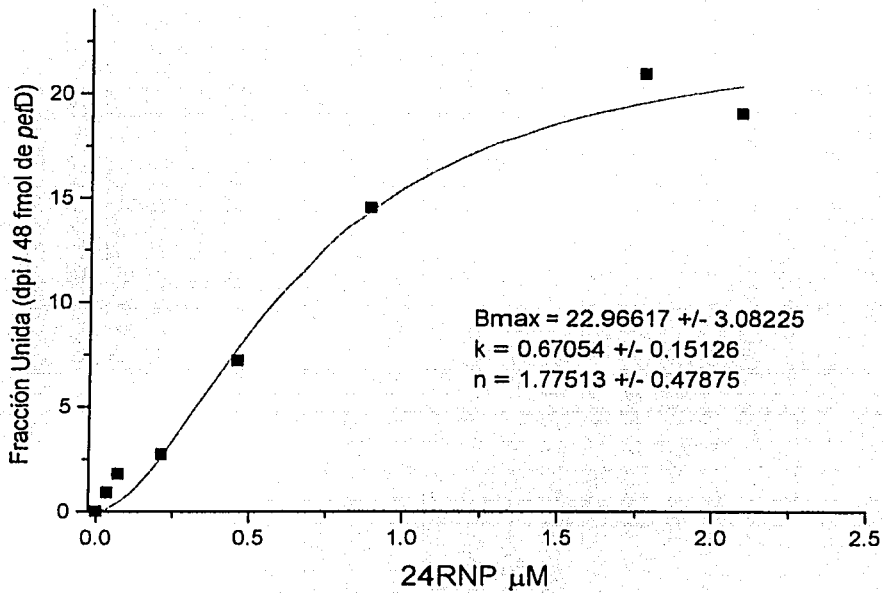
- Para reforzar la idea de los hallazgos encontrados con respecto a la presencia de afinidades diferentes por cada segmento que comprenden el 3'UTR sería conveniente realizar ensayos de competencia en geles de retardo utilizando los diferentes segmentos.

- Para tener mas información del comportamiento de la proteína, sería interesante realizar experimentos de sedimentación al equilibrio.

- Para conocer la estequiometría de unión al RNA, sería interesante realizar los geles de retardo con el RNA y la proteína marcadas (RNA-<sup>32</sup>P y la proteína-<sup>3</sup>H), (Carey, 1989).

- Finalmente, sería importante hacer ensayos de unión en las condiciones de pH y fuerza iónica presentes en el cloroplasto en el momento de la transcripción y procesamiento de mensajes.

## APENDICE 1



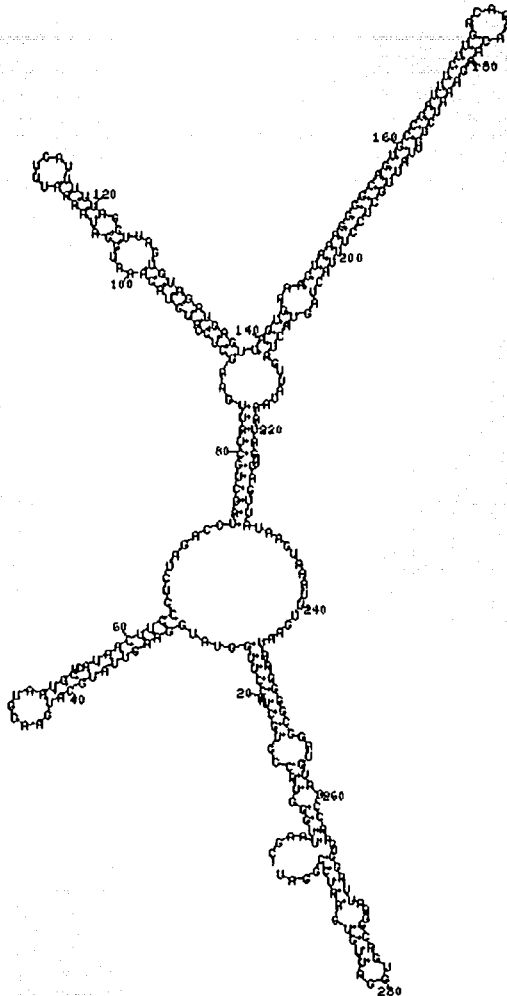
Unión de la 24RNP al extremo 3'UTRs de *petD*. Mireles 2001.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## APÉNDICE 2

pit22.jpg by D. Stewart and M. Zuker

© 2003 Washington University



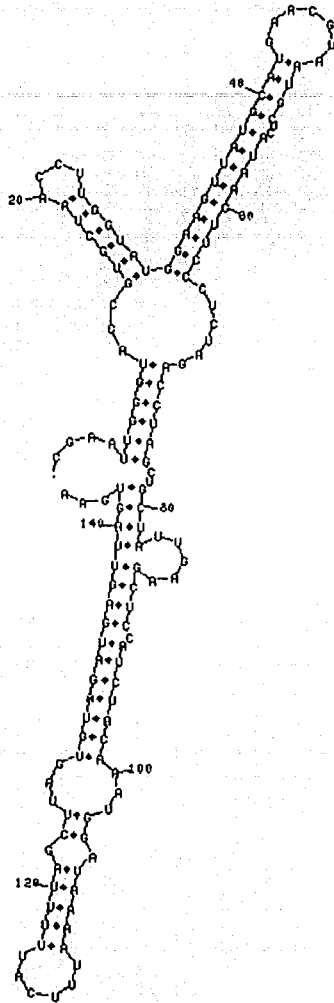
dG = -95.29 [initially -100.21] 030ct06-20-53-30

Estructura secundaria teórica del extremo 3'UTR de *psbA*.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

plt22.jpg by D. Stewart and M. Zuker

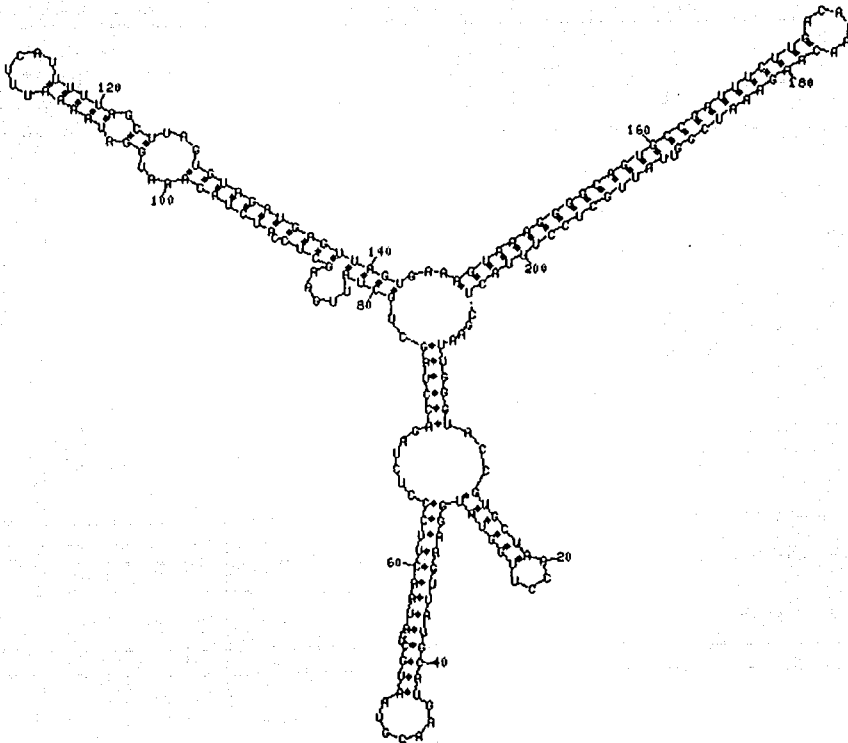
© 2003 Washington University



$\Delta G = -36.66$  [initially  $-38.71$  030ct06-20-57-46

Estructura secundaria teórica del segmento 5' de *psbA*.

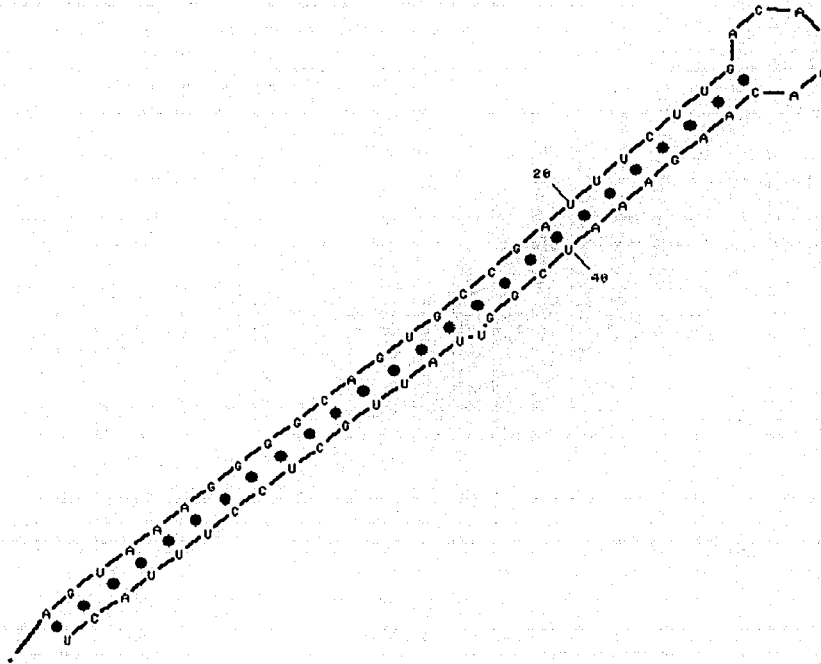
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



$\Delta G = -74.26$  [initially  $-76.31$ ] 030ct06-21-00-30

Estructura secundaria teórica del segmento 5' T-A de *psbA*.

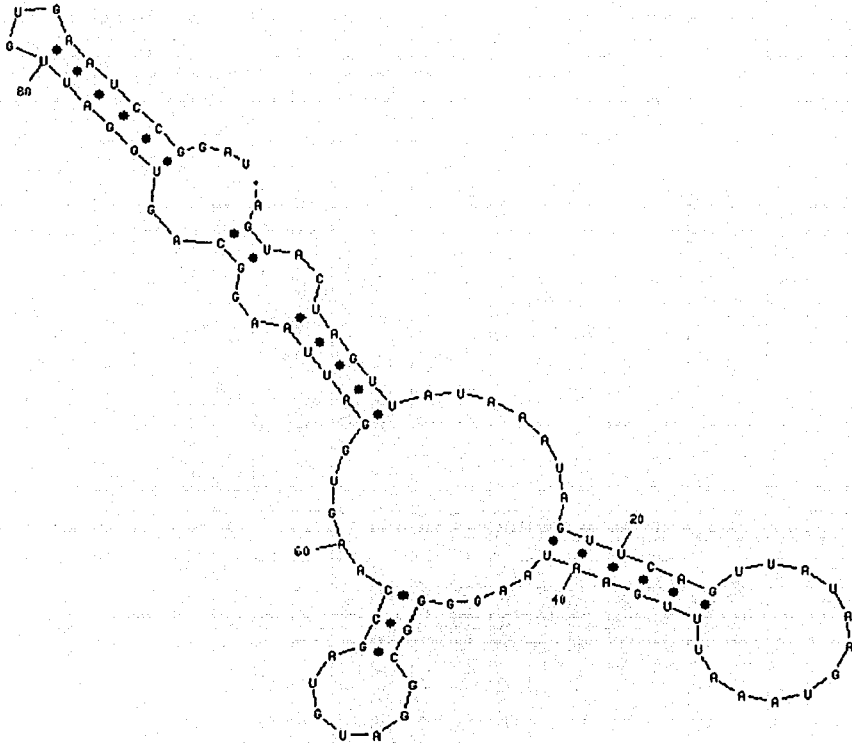
TESIS CON  
FALLA EN ORIGEN



dg = -37.8 [initially -37.3] 030ct06-21-02-31

Estructura secundaria teórica del segmento T-A de *psbA*.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

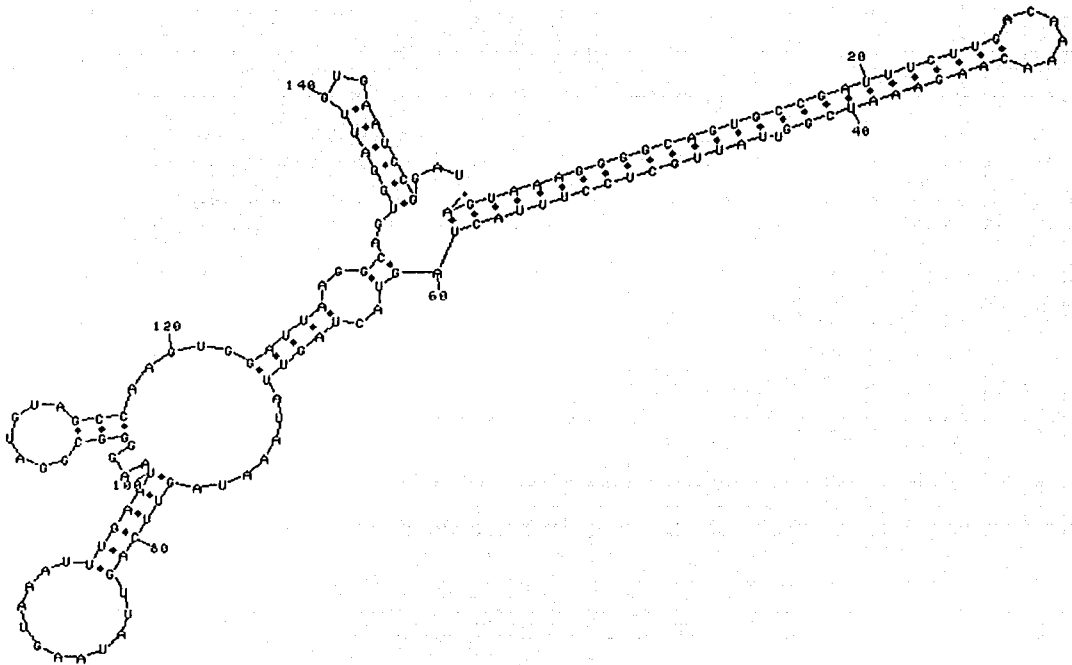


dG = -11.39 [initially -13.8] 03Oct06-21-07-34

Estructura secundaria teórica del segmento 3' de *psbA*

TESIS CON  
FALSA EN ORIGEN

g by D. Stewart and M. Zuker  
Washington University



dG = -49.89 [initially -51.6] 030ct06-21-04-29

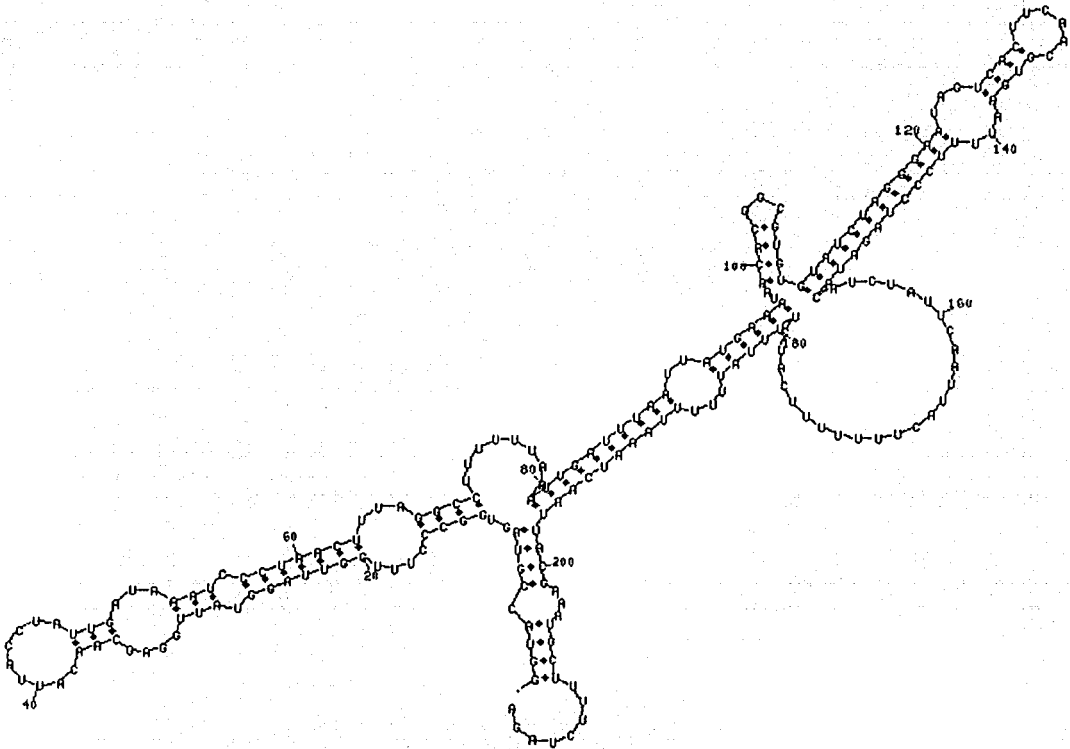
Estructura secundaria teórica del segmento T-A 3' de *psbA*.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## APÉNDICE 2

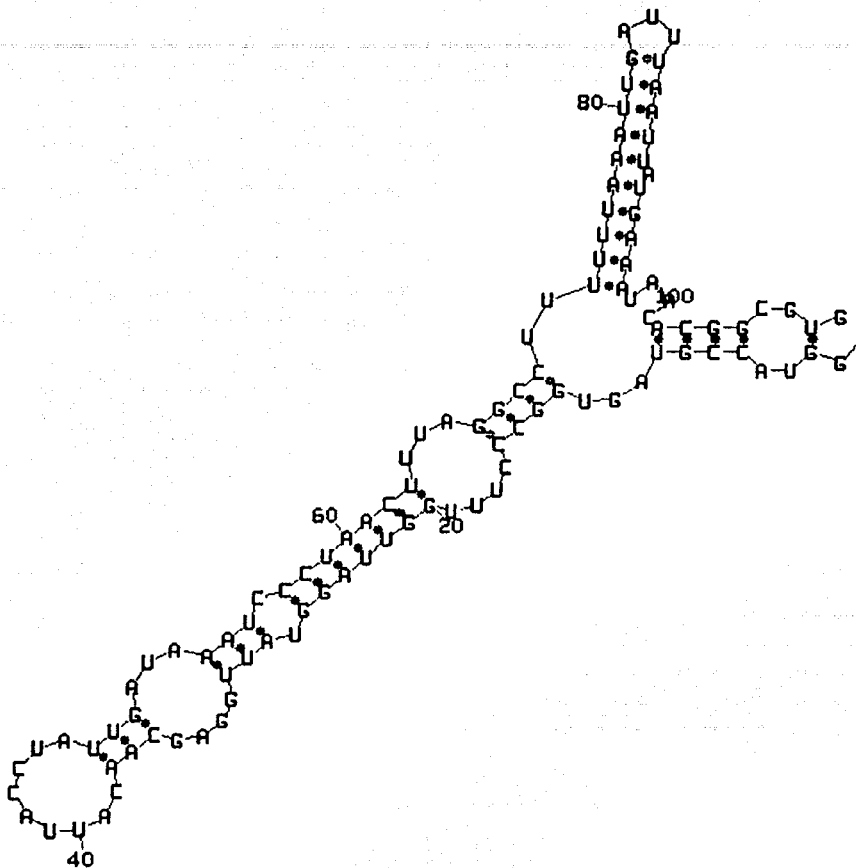
pg by D. Stewart and M. Zuker  
Washington University



$\Delta G = -51.27$  [initially  $-55.91$ ] 03Oct06-20-50-19

Estructura secundaria teórica del extremo 3'UTR de *petD*.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

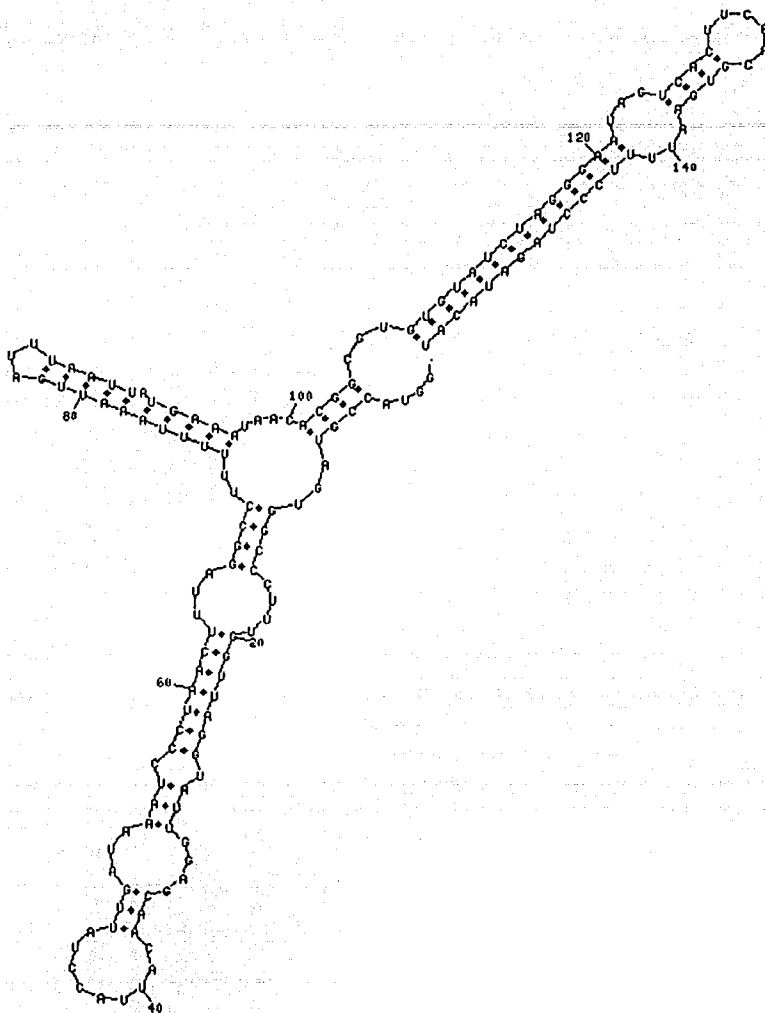


dG = -18.36 [initially -20.91 030oct.06-20-33-24

Estructura secundaria teórica del segmento 5' de *petD*.

pit22.jpg by D. Stewart and M. Zuker

© 2003 Washington University

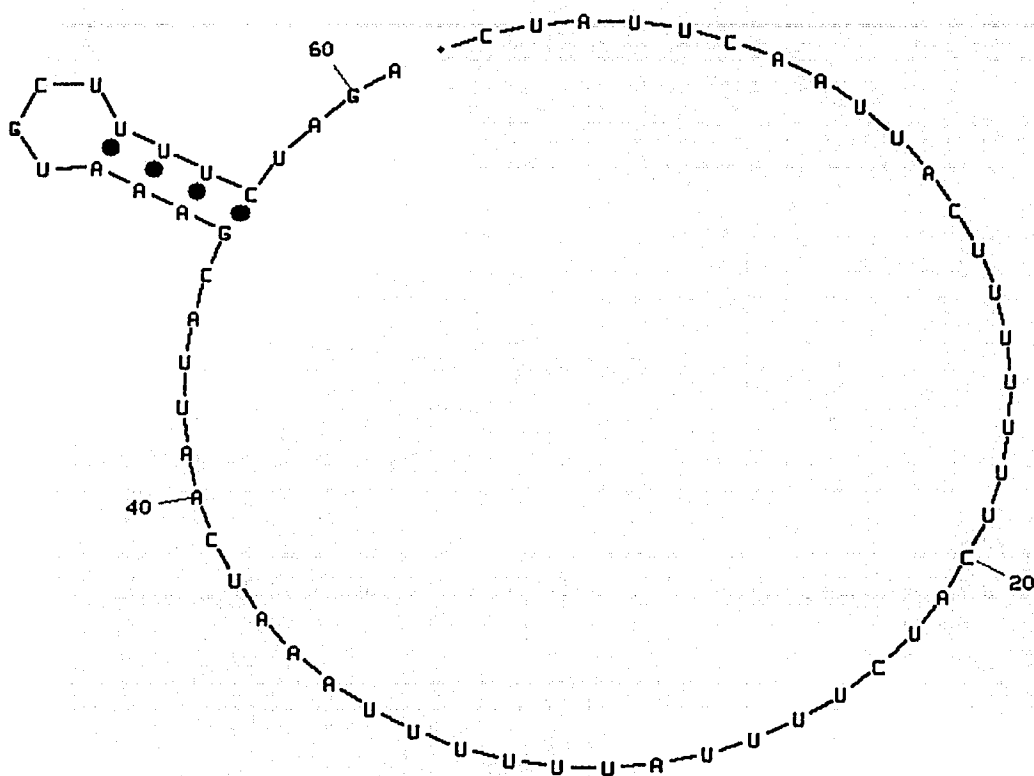


$\Delta G = -44.86$  [initially  $-47.4$ ] 030ct06-20-36-11

Estructura secundaria teórica del segmento 5' T-A de *petD*.

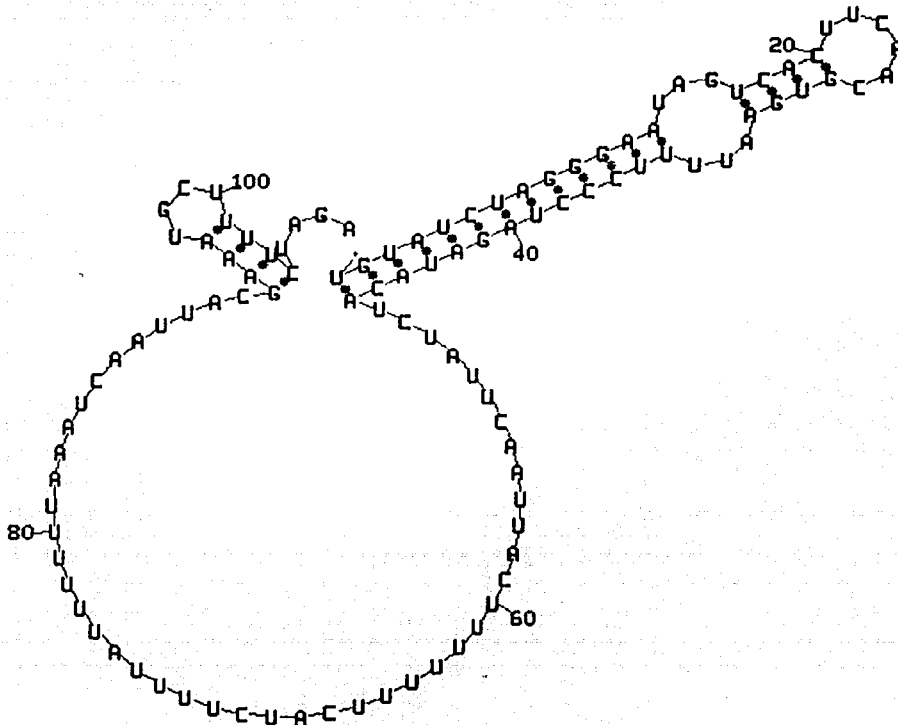
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN





dG = -1.2 [initially -1.2] 030Oct06-20-42-01

Estructura secundaria teórica del segmento 3' de *petD*.



dG = -26.9 [initially -26.91 030ct06-20-39-21

Estructura secundaria teórica del segmento T-A 3' de *petD*.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**Abler M L, Green P J.** 1996. Control of mRNA stability in higher plants. *Plant Mol Biol* 32:63-78.

**Address K, Basilion J, Klausner R, Rouault T, Pardi A.** 1997. Structure and dynamics of the iron responsive element RNA: implications for binding of the RNA by iron regulatory binding protins. *J Mol Biol* 174:72-83.

**Anantharaman V, Koonin E V, Aravind L.** 2002. Comparative genomics evolution of proteins involved in RNA metabolism. *Nucleic Acid Res* 30:1427-1464.

**Baginsky S, Gruissem W.** 2002. Endonucleolytic activation directs dark-induced chloroplast mRNA degradation. *Nucleic Acid Res* 30: 4527-4533.

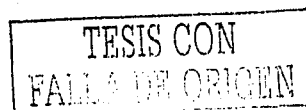
**Battle D, Doudna J.** 2001. The stem-loop binding protein forms a highly stable and specific complex with the 3' stem-loop of histone mRNAs. *RNA* 7:123-132.

**Blaxall B C, Pende A, Wu S C, Port D.** 2002. Correlation between intrinsic mRNA stability and the affinity of AUF1 (hnRNP D) and HuR for A+U-rich mRNAs. *Mol Cell Biochem* 232:1-11.

**Bollenbach T, Stern D B.** 2003. Secondary structures common to chloroplast mRNA 3'UTRs direct cleavage by CSP41, an endoribonuclease belonging to the short chain dehydrogenase/reductase superfamily. *J Biol Chem* (en prensa).

**Buzby J S, Brewer G, Nugent D J.** 1999. Developmental regulation of RNA transcript destabilization by A + U rich elements is AUF1-dependent. *J Biol Chem* 274:33973-33978.

**Cann J R.** 1996. Theory and practice of gel electrophoresis of interacting macromolecules. *Anal Biochem* 237:1-16.



Carey J. 1988. Gel retardation at low pH resolves trp repressor-DNA complex for quantitative study. Proc Natl Acad Sci USA 85:975-979.

Chen Q, Adams C, Usack L, Yang J, Monde R, Stern D. 1995. An AU-rich element in the 3' untranslated region of the spinach chloroplast *petD* gene participates in sequence-specific RNA- protein complex formation. Mol Cell Biol 15(4):2010-2018.

Cox T C, Bawden M J, Martin A, May B K. 1991. Human erythroid 5-aminolevulinatase synthase: promoter analysis and identification of an iron-responsive element in the mRNA. EMBO J 10:1891-1892.

Dehlin E, Wormington M, Corner C G, Wahle E. 2000. Cap-dependent deadenylation of mRNA. EMBO J 19:1079-1086.

Del Angel R, Papavassiliou AG, Fernández-Tomás C, Silverstein S, Racaniello V. 1989. Cell protein bind to multiple sites within the 5' untranslated region of poliovirus RNA. Proc Natl Acad Sci USA 86:8299-8303.

Del Campo E M, Sabater B, Martín M. 2002. Post-transcriptional control of chloroplast gene expression. J Biol Chem 277:36457-36464.

Díaz-Mireles E. 2001. Fosforilación de la proteína de 24 kDa (24RNP) y su efecto en la afinidad al extremo 3' de *petD* de RNA de cloroplasto. Tesis de Maestría en C. Bioquímicas. Facultad de Química. UNAM.

Dreyfuss G, Matunis M, Piñol-Roma S, Burd C. 1993. hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. Annu Rev Biochem 62:289-321.

Fedoroff N V. 2002. RNA-binding proteins in plants: the tip of an iceberg?. Curr Opin Plant Biol 5:452-459.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Fujiwara M, Yoshida S. 2001.** Chloroplast targeting of chloroplast division Fts Z2 proteins in *Arabidopsis*. *Biochem Biophys Res Comm* 287:462-467.

**Gao M, Wilusz C, Peltz S W, Wilusz J. 2001.** A novel mRNA-decapping activity in HeLa cytoplasmic extracts is regulated by AU-rich elements. *EMBO J* 20:1134-1143.

**Gil P, Liu Y, Orbovic V, Verkamp E, Poff K L, Green P J. 1994.** Characterization of the auxin-incucible SAUR-AC1 gene for use as a molecular genetic tool in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 104:777-784.

**Goessling L S, Mascotti D P, Thach R E. 1998.** Involvement of heme in the degradation of iron regulatory protein 2. *J Biol Chem* 273:12555-12557.

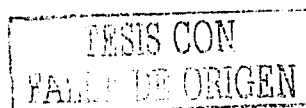
**Gray M K, Pantopoulos K, Dandekar T, , Ackrell B C A, Hentze M W. 1996.** Translational regulation of mammalian and *Drosophila* citric acid cycle enzymes via iron-responsive elements. *Proc Natl Acad Sci* 93:4925-4930.

**Graziadei I, Weiss G, Bohm A, Werner-Felmayer G, Vogel W. 1997.** Unidirectional upregulation of the synthesis of the major iron proteins, transferrin-receptor and ferritin, in HepG2 cells by the acute-phase protein  $\alpha$ 1-antitrypsin. *J Hepatol* 27:716-725.

**Gruissem W, Barkan A, Deng X, Stern D. 1988.** Transcriptional and post-transcriptional control of plastid mRNA levels in higher plants. *Trends Genet* 4:258-263.

**Hanson E S, Leibold E A. 1998.** Regulation of iron regulatory protein 1 during hypoxia and hypoxia/reoxygenation. *J Biol Chem* 273:7588-7593.

**Hayes R, Kudla J, Schuster G, Gabay L, Maliga P, Gruissem W. 1996.** Chloroplast mRNA 3' end processing by a high molecular weight protein complex is regulated by nuclear encoded RNA binding proteins. *EMBO J* 15:1132-1141.



- Henderson B, Menotti E, Kühn L.** 1996. Iron regulatory proteins 1 and 2 bind distinct sets of RNA target sequences. *J Biol Chem* 271:4900-4908.
- Hernández-Navarro A.** 2000. Establecimiento de las condiciones para la inmunosustracción de la 24RNP de un extracto de procesamiento de RNA de cloroplasto de espinaca. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
- Hoff A V, Parker R.** 2002. Messenger RNA degradation: beginning at the end. *Curr Biol* 12:R285-R287.
- Hsu-Ching C, Stern D B.** 1991a. Specific binding of chloroplast protein *in vitro* to the 3' untranslated region of spinach chloroplast *petD* mRNA. *Mol Cell Biol* 11:4380-4388.
- Hsu-Ching C, Stern D B.** 1991b. Specific ribonuclease activities in spinach chloroplasts promote mRNA maturation and degradation. *J Biol Chem* 266:24205-24211.
- Ion C B, Cohen A, Danon A, Mayfield SP.** 1998. A poly(A) binding protein functions in the chloroplast as a message-specific translation factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:2238-2243.
- Iratni R, Baeza R, Andreeva A, Mache R, Lerbs-Mache S.** 1994. Regulation of the rDNA transcription in chloroplast: promoter exclusion by a constitutive repression. *Genes Dev* 8:2928-2938.
- Kim M, Crhristopher D A, Mullet J E.** 1993. Direct evidence for selective modulation of *psbA*, *rpoA*, *rbcL* and 16S RNA stability during barley chloroplast development. *Plant Mol Biol* 22:447-463.
- Klaff P, Gruissem W.** 1991. Change in chloroplast mRNA stability during leaf development. *Plant Cell* 3:517-529.

**Klaff P, Riesner D, Steger G. 1996. RNA structure and the regulation of gene expression. Plant Mol Biol 32:89-106.**

**Kloc M, Zearfoss N R, Etkin L D. 2002. Mechanisms of subcellular mRNA localization. Cell 108:533-544.**

**Köhler S A, Henderson B R, Kühn L C. 1995. Succinate dehydrogenase b mRNA of *Drosophila melanogaster* has a functional iron-responsive element in its 5'-untranslated region. J Biol Chem 270:30781-30786.**

**Kuzmič P. 1996. Program DYNAFIT for the analysis of enzyme kinetic data: application to HIV proteinase. Anal Biochem 237:260-273.**

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

**Lagnado C, Brown C, Goodall G. 1994. AUUUA is not sufficient to promote poly A shortening and degradation of an mRNA: the functional sequence within AU-rich elements may be UUAUUUA(U/A)(U/A). Mol Cell Biol 14:7984-7995.**

**LaGrandeur T E, Parker R. 1998. Isolation and characterization of Dcp1p, the yeast mRNA decapping enzyme. EMBO J 17:1487-1496.**

**Lamb C, Dixon R A. 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 48:251-275.**

**Ledman P J, Stein A R, Chin W W, Rogers J T. 1996. Thyroid hormone modulates the interaction between iron regulatory proteins and the ferritin mRNA iron-responsive element. J Biol Chem 271:12017-12023.**

- León P, Arroyo A, Mackenzie S.** 1998. Nuclear control of plastid and mitochondrial development in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49:453-80.
- Lisitsky I, Liveanu V, Schuster G.** 1994. RNA-binding activities of the different domains of a spinach chloroplast ribonucleoprotein. *Nucleic Acids Res* 22:4719-4724.
- Lisitsky I, Schuster G.** 1995a. A method to determine the minimal number of nucleotides required for the binding of a ribonucleoprotein to RNA. *Anal Biochem* 224:603-605.
- Lisitsky I, Schuster G.** 1995b. RNA-binding characteristics of a ribonucleoprotein from spinach chloroplast. *Plant Physiol* 107:933-941.
- Lisitsky I, Schuster G.** 1995c. Phosphorylation of chloroplast RNA-binding protein changes its affinity to RNA. *Nucleic Acids Res* 23:2506-2511.
- McClure B A, Hagen G, Broun C S, Gee M A, Guilfoyle T J.** 1989. Transcription, organization, and sequence of an auxin-regulated gene cluster in soybean. *Plant Cell* 1:229-239.
- Mehdy M C, Brodl M R.** 1998. The role of stress in regulating mRNA stability. A look beyond transcription: mechanisms determining mRNA stability and translation in plants. *American Society of Plant Physiologist*. 55-62p.
- Mignone F, Gissi C, Liuni S, Pesole G.** 2002. Untranslated regions of mRNA. *Gen Biol* 3:4.1-4.10.
- Mitchell P, Tollervey D.** 2000. Musing on the structural organization of the exosome complex. *Nature Struct Biol* 7:843-846.

**Monde R A, Greene J C, Stern D B. 2000.** The sequence and secondary structure of the 3'-UTR affect 3' end maturation, RNA accumulation, and translation in tobacco chloroplasts. *Plant Mol Biol* 44:529-542.

**Mukherjee D, Gao M, Patrick O'C, Rajmakers R, Pruijn G, Lutz C S, Wilusz J. 2002.** The mammalian exosome mediates the efficient degradation of mRNA that contains AU-rich elements. *Mol Cell Biochem* 21:165-174.

**Mullet J. 1993.** Dynamic regulation of chloroplast transcription. *Plant Physiol* 103:309-313.

**Mullet J, Klein R. 1987.** Transcription and RNA stability are important determinants of higher plant chloroplast RNA levels. *EMBO J* 6:1571-1579.

**Nakamura T, Otha M, Sugiura M, Sugita M. 2001.** Chloroplast ribonucleoproteins function as a stabilizing factor of ribosome free mRNAs in the stroma. *J Biol Chem* 276:147-152.

**Ossenbühl F, Hartmann K, Nickelsen J. 2002.** A chloroplast RNA binding protein from stromal thylakoid membranes specifically binds to the 5' untranslated region of *psbA* mRNA. *Eur J Biochem* 269:3912-3919.

**Pantopoulos K, Hentze M W. 1998.** Activation of iron regulatory protein-1 by oxidative stress *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci* 95:10559-10563.

**Phillips J D, Kinikini D V, Yu Y, Guo B, Leibold E A. 1996.** Differential regulation of IRP1 and IRP2 by nitric oxide in rat hepatoma cells. *Blood* 87:2983-2992.

**Proudfoot N J, Furger A, Dye M J. 2002.** Integrating mRNA processing with transcription. *Cell* 108:501-512.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Reed R, Hurt E.** 2002. A conserved mRNA export machinery coupled to pre-mRNA splicing. *Cell* 108:523-531.

**Robida M, Merhige P.** 2002. Proteins are shared among RNA-protein complexes that form in the 5' untranslated regions of spinach chloroplast mRNAs. *Curr Gen* 41:53-62.

**Rochaix J D.** 2001. Posttranscriptional control of chloroplast gene expression. From RNA to photosynthetic complex. *Plant Physiol* 125:142-144.

**Schalinske K L, Eisenstein R S.** 1996. Phosphorylation and activation of both iron regulatory proteins 1 and 2 in HL-60 cells. *J Biol Chem* 271:7168-7176.

**Schuster G, Gruissem W.** 1990. Protocols from the "Molecular and developmental biology of plants" course. Cold Spring Harbor Laboratory.

**Schuster G, Gruissem W.** 1991. Chloroplast mRNA 3' end processing requires a nuclear-encoded RNA-binding protein. *EMBO J* 8:4163-4170.

**Schuster G, Lisitsky I, Klaff P.** 1999. Polyadenylation and degradation of mRNA in the chloroplast. *Plant Physiol* 120:937-944.

**Stern D B, Gruissem W.** 1987. Control of plastid gene expression: 3' inverted repeats act as mRNA processing and stabilizing elements, but do not terminate transcription. *Cell* 51:1145-1157.

**Stern D B, Jones H, Gruissem W.** 1989a. Function of plastid mRNA 3' inverted repeats. *J Biol Chem* 264:18742-18750.

**Stern D B, Jones H, Gruissem W.** 1989b. Function of plastid mRNA 3' inverted repeats: RNA stabilization and gene specific protein binding. *J Biol Chem* 264:18742-18750.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Stern D B, Gruissem W. 1989c. Chloroplast mRNA 3' end maturation is biochemically distinct from prokaryotic mRNA processing. *Plant Mol Biol*. 13:615-625.

Stern D B, Radwanski E R, Kindle K L. 1991. A 3' stem/loop structure of the *Chlamydomonas* chloroplast *atpB* gene regulates mRNA accumulation *in vivo*. *Plant Cell* 3:285-297.

Stern D B, Kindle K L. 1993. 3' end maturation of the *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast *atpB* mRNA is a two-step process. *Mol Cell Biol* 13:2277-2285.

Suda S, Nibuya M, Suda H, Takamatsu K, Miyazaki T, Nomura S, Kawai N. 2002. Potassium channel mRNA with AU-rich elements and brain-specific expression. *Biochem Biophys Res Comm* 291:1265-1271.

Sugiura M. 1989. The chloroplast chromosomes in land plants. *Ann Rev Cell Biol* 5:51-70.

Taylor W. 1989. Regulatory interactions between nuclear and plastid genomes. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 40:211-233.

Theil E C. 1998. Iron-responsive element (IRE) family of mRNA regulators. Regulation of iron transport and uptake in animals, plants and microorganisms. *Metal Ions in Biological Systems* 35:403-434.

Tholanikunnel B G, Raymond J R, Malbon C C. 1999. Analysis of the AU-rich elements in the 3'-untranslated region of beta 2-adrenergic receptors mRNA by mutagenesis and identification of the homologous AU-rich region from different species. *Biochem* 38:15564-15572.

**Tiller K, Link G.** 1993. Phosphorylation and dephosphorylation affect functional characteristics of chloroplast and etioplast transcription systems from mustard (*Sinapis alba* L.). *EMBO J* 12:1745-53.

**Toledo-Ortiz G.** 1998. Estudio de la función de la proteína 24 kDa que se une a RNA (24RNP) durante el procesamiento y estabilización de los mRNAs de cloroplasto. Tesis de Maestría en C. Bioquímicas. Facultad de Química. UNAM.

**Varani G, Nagai K.** 1998. RNA recognition by RNP proteins during RNA processing. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 27:407-445.

**Vasudevan S, Peltz S W.** 2001. Regulated ARE-mediated mRNA decay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* 7:1191-1200.

**Wang W, Yang X, Cristofalo V, Holdbrook N, Gorospe M.** 2001. Loss of HuR is linked to reduced expression of proliferative genes during replicative senescence. *Mol Cell Biol* 21:5889-5898.

**Weiss G, Houston T, Kasther S, Jöhrer K, Grünewald K, Brock J H.** 1997. Regulation of cellular iron metabolism by erythropoietin: activation of iron-regulatory protein and upregulation of transferrin receptor expression in erythroid cells. *Blood* 89:680-687.

**Yang J, Schuster G, Stern D B.** 1996. CSP41, a sequence-specific chloroplast mRNA binding protein, is an endoribonuclease. *Plant Cell* 8:1409-1420.

**Ye L, Sugiura M.** 1992. Domains required for nucleic acid binding activities in chloroplast ribonucleoproteins. *Nuc Acid Res* 20:2675-6279.

**Yehudai-Resheff S, Hirsh M, Schuster G.** 2001. Polynucleotide phosphorylase functions as both an exonuclease and a poly(A) polymerase in spinach chloroplast. *Mol Cel Biol* 21:5408-5416.

TESIS CON  
VALOR DE ORIGEN



Zubiaga A, Belasco J, Greenberg M. 1995. The nonamer UUAUUUAUU is the key AU-rich sequence motif that mediates mRNA degradation. Mol Cel Biol 15:2219-2230.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN