



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Expresión de los genes que codifican las proteínas de unión a RNA (29RNP, 31RNP y 33RNP) en tejidos de *Arabidopsis thaliana* que contienen diferentes tipos de plastidios.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G O
P R E S E N T A :
OMAR ZAMORA SÁNCHEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. HERMINIA DE JESÚS LOZA TAVERA



2004 DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES
FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Expresión de los genes que codifican las proteínas de unión a RNA (29RNP, 31RNP y 33RNP) en tejidos de Arabidopsis thaliana que contienen diferentes tipos de plastidios"

realizado por Omar Zamora Sánchez

con número de cuenta 09219678-2 , quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dra. Herminia de Jesús Loza Tavera

Propietario

M. en C. Martín Pedro Vargas Suárez

Propietario

M. en C. Homero Reyes de la Cruz

Suplente

Dra. Patricia Guevara Fefer

Suplente

Dra. Cristina García Flores

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO
FACULTAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

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

NOMBRE: Zamora Sánchez Omar

FECHA: 10/II/04

FIRMA: P.A. Edette Saucé

AGRADECIMIENTOS

Agradezco sinceramente:

Al CONACYT (proyecto 25199N), a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico U.N.A.M. (DGAPA, proyectos IN225001, IN205697) y al PAIP-FQ (6290-04) por el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo.

Al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas de la Facultad de Química, UNAM por permitirme llevar a cabo este trabajo en sus instalaciones.

Al Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología por permitirme realizar parte de este trabajo en sus instalaciones.

A la Dra. Herminia Loza Tavera por permitirme trabajar dentro de su laboratorio, iniciarme en el camino de la investigación y por ser esencial en mi formación académica y en mi vida personal.

A la Dra. Patricia León Mejía por proporcionarnos la mutante cla 1-1 y por su asesoría y apoyo.

Al Dr. Rafael Moreno Sánchez por su apoyo para la realización de este trabajo y por sus sugerencias al mismo.

Al M. en C. Martín Pedro Vargas por la asesoría técnica y la enseñanza, por las contribuciones durante la realización de este trabajo y por su amistad.

A mis amigos del Lab. 105, Ale, Edith, Andrea, Caty, Sandra, César y Martín por todos los momentos de trabajo, estudio y amistad que compartimos. A los del 103, Leo, Cristi, Homero y, sobretodo, mi profundo agradecimiento para Alfredo dondequiera que esté.

CONTENIDO

I.	RESUMEN	1
II.	INTRODUCCIÓN	2
III.	ANTECEDENTES	3
	1. Plastidios	3
	1.1. Proplastidios.....	6
	1.2. Amiloplastos.....	7
	1.3. Etioplastos.....	7
	1.4. Cloroplastos.....	7
	1.5. Cloroplastos senescentes.....	8
	2. Regulación de la expresión genética del cloroplasto.	8
	3. Proteínas de unión a RNA (RNPs).	9
	3.1. RNPs de cloroplasto.....	10
	3.2. RNPs cloroplásticas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	13
	4. Arabidopsis thaliana como modelo	14
	4.1. La mutante <i>cla1-1</i>	15
IV.	OBJETIVOS	17
V.	HIPÓTESIS	18
VI.	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	19
VII.	MATERIALES Y MÉTODOS	
	1. Obtención de tejido con distintos tipos de plastidios.	20
	1.1. Esterilización y siembra de semillas.....	20
	1.2. Condiciones de cultivo.....	20
	2. Extracción de proteínas de tejidos vegetales.	21

3. Cuantificación de proteína.	22
4. Determinación de los niveles de la cp29, cp3 y cp33.	23
4.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturante (PAGE-SDS)	23
4.2. Transferencia de proteínas a membranas	24
4.3. Anticuerpos utilizados en la inmunodetección de la cp29	25
4.4. Inmunodetección de las proteínas	26
5. Preparación de sondas.	27
5.1. Descripción de los cDNAs empleados como sonda	27
5.2. Extracción rápida de DNA plasmídico	28
5.3. Liberación de los insertos por restricción	29
5.4. Electroforesis de DNA	30
5.5. Purificación de DNA a partir de geles de agarosa	31
5.6. Marcaje de los insertos con ³² P mediante Random Primer	32
5.7. Purificación de la sonda	33
6. Extracción de RNA total de tejidos vegetales.	34
6.1 Cuantificación de RNA	35
7. Determinación de los niveles de mRNA de las RNPs.	35
7.1. Electroforesis de RNA en geles desnaturantes de agarosa	35
7.2. Transferencia de RNA a membranas de nylon	36
7.3. Northern blot	37
7.4. Estimación de la cantidad de mensajeros	38

VIII. RESULTADOS

1. Los anticuerpos contra la cp29 también reconocen a la cp31 y cp33.	39
--	----

2. Determinación de los niveles de la cp29, cp31 y cp33 en tejidos con distintos tipos de plastidios.	40
3. Determinación de los niveles de mRNA de las cp29, cp31 y cp33 en tejidos con distintos tipos de plastidios.....	44
4. Análisis Global.....	47
IX. DISCUSIÓN	49
X. CONCLUSIONES	52
XI. APÉNDICES.....	53
XII. BIBLIOGRAFÍA.....	58

ABREVIATURAS

a a	Aminoácido
Amp	Ampicilina
APS	Persulfato de amonio
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
BSA	Albúmina de suero de bovino
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilendiamintetracético
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
h	Hora
Kan	Kanamicina
Kpb	Kilo pares de bases
KDa	Kilodaltones
LB	Medio Luria-Brot
min	Minutos
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
RNA	Ácido ribonucleico
RNAsa	Ribonucleasa
RNP	Proteína de unión a mRNA
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TAE	Amortiguador de Tris, acetatos y EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
UTR	Región no traducible
UV	Ultravioleta

I. RESUMEN

En plantas, algunas proteínas de unión a RNA (RNPs) forman complejos que intervienen en el correcto procesamiento de los extremos 3' no traducibles (3' UTR) o en los procesos de edición del mRNA de cloroplasto.

El objetivo de este trabajo fue determinar si existe una expresión diferencial de las RNPs cp29, cp31 y cp33 (homólogas a las de tabaco y espinaca) y sus mensajes correspondientes en tejidos de *Arabidopsis thaliana* que contienen diferentes tipos de plastidios. Para ello, se aislaron proteínas y RNA total de tejidos con distintos tipos de plastidios: amiloplastos, etioplastos, cloroplastos senescentes y proplastidios. Estos últimos se tomaron de una mutante de *Arabidopsis thaliana* (cla1-1) que presenta plastidios muy similares a los proplastidios. Usando anticuerpos contra la cp29 y sondas de DNA de los genes *athcp29*, *athcp31* y *athcp33*, se determinó el nivel acumulado de las proteínas cp29, cp31 y cp33 y sus mensajeros correspondientes, por Western blot y Northern blot respectivamente.

De los experimentos realizados se encontró que existe acumulación de proteínas cp29, cp31 y cp33 en tejidos con proplastidios y cloroplastos, que no hay acumulación de proteínas cp29, cp31 y cp33 en tejidos con amiloplastos y que la acumulación de cp29 en tejidos con etioplastos y cloroplastos senescentes se ve disminuida, mientras que cp31 y cp33 no fueron detectadas en tejidos con etioplastos y cloroplastos senescentes. Hay transcripción de los genes *athcp29*, *athcp31* y *athcp33* en tejidos con cloroplastos y sólo de los genes *athcp29*, *athcp31* en tejidos con proplastidios. Por lo que se concluye que existe expresión diferencial de la cp29, cp31 y cp33 en tejidos con distintos tipos de plastidios.

II. INTRODUCCIÓN

Los plastidios son organelos característicos de las células vegetales que les confieren a éstas funciones y actividades específicas. Estos organelos cuentan con su propio genoma. Éste es muy pequeño y tan solo contiene algunos cuantos genes reguladores. Se ha planteado que el principal mecanismo de regulación del genoma cloroplástico se lleva a cabo a nivel postranscripcional, estabilizando o procesando los mRNAs cloroplásticos (Deng *et al.*, 1988; Grissem *et al.*, 1988).

Se ha sugerido que proteínas nucleares regulan la expresión de genes plásticos a nivel postranscripcional (Mullet, 1993; Taylor 1989). En espinaca se han identificado algunos factores que participan en este proceso de regulación; dichos factores son proteínas de unión a mRNA cuyas funciones no se han elucidado completamente. Estas proteínas también se han encontrado en plantas como tabaco (Li y Sugiura, 1990; Ye *et al.*, 1991), maíz (MA16) (Ludevid *et al.*, 1992) (NBP) (Cook y Walker, 1992) y *Arabidopsis thaliana* (cp29, cp31 y cp33) (Ohta *et al.*, 1995; Hirose y Sugiura, 2001).

Unas de las RNPs vegetales más estudiadas son las de espinaca, las cuales son codificadas en núcleo, se asocian a complejos de alto peso molecular e intervienen en el procesamiento de los extremos 3' no traducibles (3'UTRs) de mRNAs de cloroplasto (Schuster y Grissem, 1991; Hayes *et al.*, 1996). Otro ejemplo son las proteínas encontradas en tabaco que intervienen en los procesos de edición y estabilidad de transcritos cloroplásticos (Hirose y Sugiura, 2001).

En *Arabidopsis thaliana* se han identificado y caracterizado tres proteínas de unión a RNA: la cp29, cp31 y cp33; aunque poco se ha estudiado el papel que juegan en los eventos postranscripcionales. La mayoría de los ensayos para caracterizar la función de las RNPs de cloroplasto se han llevado a cabo *in vitro* (Schuster y Grissem, 1991; Lisitsky *et al.*, 1995; Toledo, 1998).

Aunque se sabe que los genes de la cp29, cp31 y cp33 se expresan más en hoja que en raíz (Ohta *et al.*, 1995), se desconoce cuales son los niveles de las proteínas que codifican, durante la diferenciación de los plastidios.

Como una primera aproximación al conocimiento de la regulación de la expresión de las RNPs de *Arabidopsis thaliana*, en este trabajo se determinaron los patrones de expresión de las proteínas cp29, cp31 y cp33 y de sus mensajeros correspondientes, en tejidos con distintos tipos de plastidios. Para ello se tomó como base el modelo de diferenciación del plastidio, propuesto por Whatley, en el cual propone siete estadios sucesivos en este proceso: eoplasto, amiloplasto, plastidio ameboso, y plastidio pregranal, etioplasto, cloroplasto maduro y cloroplasto senescente (Thomson y Whatley, 1980). Este modelo considera estadios de diferenciación en la biogénesis del cloroplasto, con características bioquímicas y morfológicas específicas inducidas por condiciones de luz y desarrollo morfogénico (Thomson y Whatley, 1980).

Los tejidos con los distintos tipos de plastidios (proplastidios, cloroplastos, etioplastos, amiloplastos y cloroplastos senescentes) se obtuvieron de la siembra y cultivo de plantas silvestres y mutantes de *Arabidopsis thaliana*. Así, para obtener proplastidios se cultivaron plantas de *A. thaliana* con la mutación CLA 1-1 que presenta plastidios detenidos en etapas tempranas de diferenciación (proplastidios) (Mandel *et al.*, 1993). Para la obtención de cloroplastos se sembraron plantas silvestres de *Arabidopsis thaliana*. Las raíces de estas plantas se usaron para obtener el tejido con amiloplastos. Los etioplastos se obtuvieron de cultivar plantas silvestres en oscuridad y finalmente el tejido que contiene cloroplastos senescentes se obtuvo de plantas silvestres cultivadas en luz normal y posteriormente transferidas a oscuridad durante dos semanas.

III. ANTECEDENTES

1. Plastidios

Los plastidios son organelos que distinguen a las células vegetales del resto de las células eucariontes. Su existencia se explica por la teoría de la endosimbiosis, argumentando su origen a partir de un organismo procarionte. Aunque el origen mono o polifilético de los plastidios no ha sido esclarecido por completo (Audersik, 1996), éstos son una parte esencial del funcionamiento de las células vegetales, aún cuando son semiautónomos y contienen su propio material genético. El genoma plastídico es

una molécula de DNA circular, que en plantas vasculares es de aproximadamente 120 a 217 Kpb. Cada organelo presentan entre 22 y 900 copias de su genoma. La composición y organización del DNA son similares en plastidios fotosintéticos y no fotosintéticos (Mullet, 1988; Pyke, 1999). El DNA que contienen no está asociado a membrana interna ni a histonas (Audersik,1996), y codifica aproximadamente 135 genes dependiendo de la especie. La mayoría de estos genes están relacionados directa o indirectamente con la fotosíntesis y con los procesos de transcripción y traducción dentro del cloroplasto (Mullet, 1988; Taylor, 1989). Sin embargo, los genes cloroplásticos no son los únicos genes que se requieren para la síntesis de proteínas y la regulación de la expresión genética del organelo (Tabla 1). Existen otros genes que se encuentran en el núcleo, y que se sugiere se originaron previamente a la divergencia entre procariontes y eucariontes, como es el caso de las RNPs (Fukammi *et al.*, 1993).

Los plastidios se localizan en las células de todos los órganos vegetales, presentando diferencias en cuanto a tamaño, pigmentación, actividad bioquímica y función dentro de las células. Así, los plastidios se pueden clasificar de diferentes maneras de acuerdo a estas características, pero no siempre las clasificaciones responden a un significado biológico (Pike, 1999). Una clasificación muy usual está hecha con base en la actividad fotosintética, de tal modo que encontramos plastidios fotosintéticos o cloroplastos y plastidios no fotosintéticos.

Dentro de los plastidios sin capacidad fotosintética se encuentran los proplastidios, presentes en las células indiferenciadas; los etioplastos presentes en plantas crecidas en oscuridad y que son precursores de los cloroplastos; los cromoplastos, que son plastidios especializados en la síntesis o acumulación de carotenoides y los amiloplastos, que están relacionados con la síntesis y acumulación de almidón, terpenoides y lípidos (Mullet, 1988).

Los plastidios sufren un proceso de diferenciación durante la vida de la célula vegetal, pues se transforman en un tipo particular de plastidio de acuerdo al tipo de célula en la que residen (Pyke, 1999; Taylor, 1989). Es por esta capacidad de transformación morfológica y funcional, es decir, por su plasticidad, que el nombre de plastidios resulta ser el más acertado para estos organelos.

Tabla 1. Ejemplos de genes codificados en plastidios (Tomado de Gruissem *et al.*, 1986).

Genes de proteínas fotosintéticas	
Fotosistema I	<i>psaA, B, C, I, J</i>
Fotosistema II	<i>psbA, B, C, D, D, E, F, H, I, K, L, M</i>
Complejo citocromo b/f	<i>petA, B, D, G</i>
ATP sintetasa	<i>atpA, B, E, F, H, I</i>
Ribulosa- 1,5- bifosfato carboxilasa	<i>rbcl</i>
Biosíntesis de clorofila .	<i>chlN, chlL</i>
Genes requeridos para las funciones genéticas de los plastidios	
Replicación de DNA	<i>ssb, dnaA, resA, uvrC, rho</i>
RNA polimerasa	<i>rpoA, B, C1, C2,</i>
Splicing	<i>tscA</i>
RNAs ribosomales	<i>rrn (16S, 23S, 4.5S, 5S)</i>
Proteínas ribosomales	<i>rpl 2, 14, 16, 20, 21, 22, 23, 33, 36</i> <i>rps 2, 3, 4, 7, 8, 11, 12, 14, 15, 16, 18</i>
tRNAs	<i>trn (30 genes para tRNAs)</i>
Traducción iniciación/alargamiento	<i>INFA, secX, tufA</i>
Proteasas	<i>clpP</i>
Genes plastídicos con funciones no identificadas	
NADH oxidoreductasa	<i>ndh A, B, C, D, E, F, E</i>
Proteínas dedos de Zinc (<i>E.coli dedB</i>)	ORF 316 (<i>Marchantia</i>), ORF512
Permeasa (<i>E.coli malK, malF</i>)	<i>mbpX, mbpY</i>

Todos los tipos de plastidios, fotosintéticos y no fotosintéticos, provienen inicialmente de los proplastidios. Whatley propone un modelo de siete estadios sucesivos en el proceso de diferenciación: eoplasto (proplastidio), amiloplasto y plastidio amebosoide, plastidio pregranal, etioplasto, cloroplasto maduro y cloroplasto senescente (Figura 1) (Thomson y Whatley, 1980). Durante la diferenciación de los plastidios, éstos aumentan su número por célula y su composición bioquímica cambia con la adquisición o pérdida de la capacidad fotosintética, pudiendo pasar de un estadio a otro de acuerdo a las condiciones ambientales y los requerimientos de la planta.

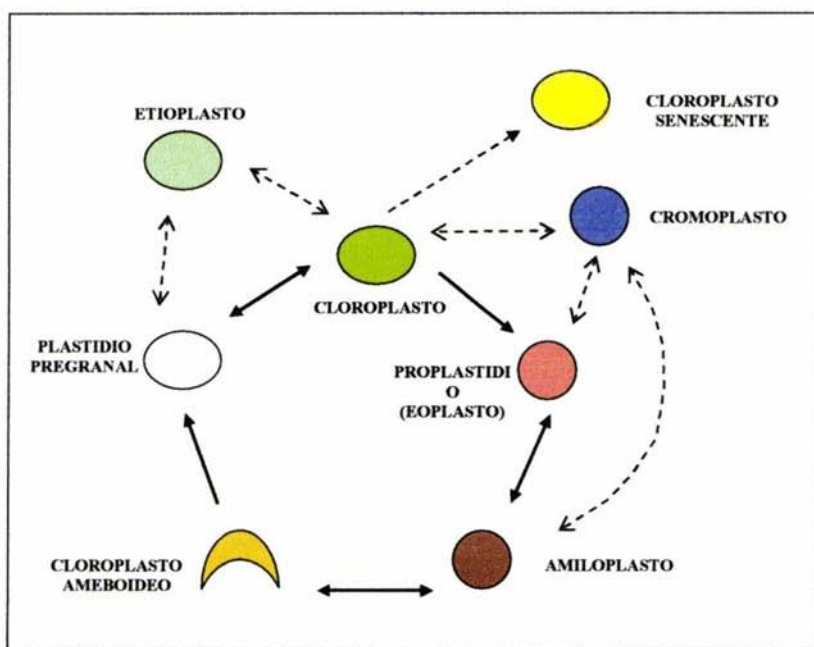


Figura 1. Diferenciación de plastidios. Se muestran los estadios y vías de diferenciación de los plastidios (Thomson y Whatley, 1980).

1.1. Proplastidios.

Todos los plastidios derivan de proplastidios indiferenciados que se encuentran dentro de las células meristemáticas. Son esféricos, de tamaño entre $0.5 \mu\text{m}$ y $10 \mu\text{m}$ de diámetro, aunque pueden presentar forma ameboidea. Carecen de un sistema interno de membranas desarrollado y son incoloros. Normalmente se encuentran de 10 a 20 proplastidios en cada célula meristemática, los cuales, previamente a la división celular, se dividen para mantener el mismo número en cada célula después de la mitosis (Mullet, 1988).

Los proplastidios contienen bajos niveles de RNA, y ribosomas, así como de proteínas solubles. Esto sugiere que los genes nucleares y cloroplásticos presentan niveles basales en su expresión durante la división de las células meristemáticas, lo que permite perpetuar la población de proplastidios por célula (Mullet, 1988; Pyke, 1999). Estos organelos contienen una gran cantidad de lípidos y fosfatidil colina. Se ha

propuesto que su actividad bioquímica puede estar asociada al metabolismo de carbohidratos en las células meristemáticas (Kirk, 1978).

1.2. Amiloplastos.

Estos organelos se encuentran en distintos tipos de tejidos, en los de almacenamiento como la raíz o en los meristemas. Se forman directamente de los proplastidios (eoplastos) o por diferenciación de cloroplastos. Son generalmente de forma esférica y contienen una gran cantidad de almidón almacenada en gránulos, por lo que claramente se distinguen del resto de los plastidios. La presencia de estos gránulos de almidón se atribuye a una forma de almacenamiento de carbohidratos cuando se encuentran en exceso dentro de la célula (Kirk, 1978; Tohomson y Whatley, 1980). Los amiloplastos son también considerados plastidios bien diferenciados y asociados a mecanismos de percepción gravitatoria y geotropismo (Kirk, 1978; Pyke, 1999).

1.3. Etioplastos.

Etioplastos es el nombre que se da a los plastidios que se encuentran en las hojas de plantas que crecen en la oscuridad. Son generalmente de forma elíptica y contienen casi todos los componentes químicos de un cloroplasto. En relación al cloroplasto solo presentan un 54% de proteínas, las cuales aún no están bien caracterizadas. Podemos mencionar que contiene RUBISCO, protoclorofilas, quinonas y enzimas fotosintéticas en muy bajos niveles (Kirk, 1978).

De forma natural los podemos encontrar en las hojas primordiales o en los cotiledones. Los etioplastos se consideran como un estadio temporal en el desarrollo del cloroplasto ya que tienen una rápida adquisición de la capacidad fotosintética cuando son estimulados por luz. Para Mullet (1988) es un estado variable y no siempre presente en las células vegetales. Su principal característica es tener muy compacto el cuerpo prolamelar que forma los tilacoides.

1.4. Cloroplastos.

Los cloroplastos son plastidios fotosintéticos. El desarrollo del cloroplasto está asociado a la formación de los meristemas de hojas y las células del mesófilo, así como a la influencia de la luz. Los cloroplastos están envueltos por una doble

membrana, una externa y otra interna, con un grosor de aproximadamente 8 nm cada una. Dichas membranas están separadas por un espacio interno que mide de 10 a 20 nm. En el interior del cloroplasto se encuentra un medio acuoso conocido como estroma. La característica principal del cloroplasto es la prominente membrana interna que se conoce como membrana tilacoidal y que contiene un medio acuoso llamado lumen. Esta membrana se distribuye en forma de lamelas aplanadas que forman apilamientos, llamados grana (Mullet, 1988; Audersik, 1996).

1.5. Cloroplastos senescentes.

Los cloroplastos senescentes se encuentran en las hojas viejas, han perdido su capacidad fotosintética y su sistema interno de membranas se ha descompuesto (Thomson y Whatley, 1980). En ellos existen altos niveles de actividad de proteasa que se encargan de degradar las proteínas del cloroplasto.

2. Regulación de la expresión genética del cloroplasto

Muchos de los procesos biosintéticos inducidos durante la diferenciación del cloroplasto requiere de la activación coordinada de genes nucleares y cloroplásticos (Mullet, 1988; Goldschmidt, 1998).

Los genes codificados en el cloroplasto están típicamente organizados en transcritos policistrónicos que deben ser procesados para obtener mensajeros estables. Este procesamiento puede incluir splicing, edición o modificaciones a los extremos 5' y 3'. La regulación de la expresión de los genes del cloroplasto puede darse a diferentes niveles: iniciación de la transcripción, recambio de los transcritos, eficiencia de la traducción y recambio de las proteínas (Roell, 1996).

La luz juega un papel preponderante en la diferenciación de los cloroplastos (Mohr y Schopfer, 1995). Pero este factor no es el único. Se ha demostrado que un gran número de genes nucleares y plastídicos se activan durante el desarrollo del cloroplasto. El mayor cambio en los niveles de RNA plastídico ocurre durante este proceso, provocando un cambio en la estructura y actividad bioquímica del organelo. Para ello, se requiere de la expresión coordinada de genes codificados en el núcleo y en el cloroplasto, aunque lo que no es claro son los mecanismos de interacción y comunicación entre ambos organelos. Se ha sugerido que algunas proteínas nucleares

regulan la expresión de los ciertos genes plastídicos, actuando principalmente a nivel postranscripcional (Mullet, 1993; Taylor, 1989).

En experimentos realizados en plantas de tabaco, espinaca y cebada se demostró que durante el desarrollo del cloroplasto inducido por luz, la transcripción relativa de algunos genes se mantiene casi constante, no así la abundancia de algunos mRNAs que se ve alterada significativamente (Deng y Grisseem, 1987; Deng *et al.*, 1987). Esta observación sugiere que la regulación de la expresión genética del cloroplasto se puede llevar a cabo de manera postranscripcional, ya sea estabilizando o procesando los mRNAs (Gruisseem *et al.*, 1988; Deng *et al.*, 1988).

Con base en la totipotencialidad de las células vegetales y la gran capacidad de diferenciación de los plastidios, se infiere que las maquinarias de transcripción y traducción de estos organelos deben ser funcionales, al menos en niveles basales, en todas las células de la planta, con lo cual es posible el mantenimiento de la capacidad de diferenciación. Deng y Grisseem (1988) encontraron que en varios genes de amiloplastos y cloroplastos, la transcripción ocurría a velocidades iguales, pero la acumulación de mRNAs era distinta, siendo controlada por procesos postranscripcionales. Grisseem (1989) propuso que proteínas de unión a RNA juegan un papel muy importante en este proceso de regulación diferencial a nivel postranscripcional.

En espinaca se han identificado algunos factores que participan en procesos de regulación postranscripcional. Estos factores son proteínas de unión a mRNA como la 28RNP (Schuster y Grisseem, 1991) y la 24RNP cuyas funciones no se han elucidado completamente (Toledo, 1998). Estas proteínas también se han encontrado en plantas como tabaco (Li y Sugiura, 1990; Ye *et al.*, 1991), maíz (MA16) (Ludevid *et al.*, 1992) (NBP) (Cook y Walker, 1992) y *Arabidopsis thaliana* (cp29, cp31 y cp33) (Ohta *et al.*, 1995; Hirose y Sugiura, 2001). La gran mayoría de estos ensayos de caracterización de RNPs de cloroplasto se han llevado a cabo *in vitro* (Schuster y Grisseem, 1991; Lisitsky *et al.*, 1995; Toledo, 1998).

3. Proteínas de unión a RNA (RNPs)

Las RNPs son proteínas que reconocen y se unen a moléculas de RNA. Se han encontrado en gran número de organismos, desde levaduras, algas y plantas, hasta en

mamíferos como el humano. La función biológica de las RNPs es muy amplia, pueden intervenir en eventos de splicing, edición, traducción, transporte y procesamiento (Tabla 2) (Fukammi *et al.*, 1993; Fedoroff, 2002).

Tabla 2. Clasificación de las proteínas de unión a mRNA (Fukami *et al.*, 1993).

PROTEÍNAS	Función que se le atribuye	Organismos en que se encuentran
PABP Poly A binding proteins	Unión a regiones de poli (A)	<i>Drosophila</i> , <i>Xenopus</i> , humano, <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. pombe</i>
Factores de splicing	Controlan el splicing	<i>Drosophila</i> , humano, ratón, gallina
RNP's de cloroplasto	Participan en procesamiento post-transcripcional	Tabaco, espinaca, sorgo, maíz y <i>A. thaliana</i>
HnRNP's Heteronuclear ribonucleoproteins		Humano, rata, bovinos, <i>Drosophila</i> .
SnRNP's Small nuclear ribonucleoproteins		Humano, ratón, <i>Drosophila</i> .
Nucleolinas		Ratón, hámster, rata.

La principal característica de estas proteínas es la presencia de regiones conocidas como dominios de unión a RNA (RBDs), que consisten en más o menos 80 residuos de aminoácidos. Estudios de cristalografía y de resonancia magnética nuclear han demostrado que, en las proteínas snRNP y hnRNP, estos dominios tienen una estructura globular, aportando evidencia de que los RBDs son unidades estructurales y funcionales. Por otro lado, dentro de estos dominios existen motivos conservados, conocidos como RNP-1 y RNP-2. El primero (RNP-1) es una secuencia octamérica altamente conservada (RGFGFVXW), mientras que el segundo (RNP-2) es una secuencia hexamérica menos conservada (LFVGNL). La mayoría de los residuos conservados resultan ser hidrofóbicos, constituyendo un centro con esta característica dentro de los dominios de unión a RNA (Fukammi *et al.*, 1993; Shamoo *et al.*, 1994). Además de RNP-1 y RNP-2 existen otros dominios auxiliares que pueden ser ricos en glicina, serina o de carácter ácido.

En plantas se han identificado varias proteínas de unión a RNA. Aunque no se ha podido establecer con certeza su función específica (Ni *et al.*, 2000). Algunas intervienen como factores de procesamiento, de edición de mRNA cloroplástico y splicing (Vian *et al.*, 1999; Hirose y Sugiura, 2001). La mayoría de estos trabajos se han realizado en especies como *Arabidopsis thaliana*, espinaca (*Spinacea oleracea*), tabaco (*N. silvestris* y *N. plumbaginifolia*) y tomate (*Lycopersicon esculentum*).

Dado que los RBDs se encuentran presentes en proteínas cloroplásticas se ha sugerido, con base en la teoría endosimbiótica, que estos dominios aparecieron previamente a la divergencia entre procariontes y eucariontes (Fukammi *et al.*, 1993).

3.1. RNPs de cloroplasto.

Existen proteínas de unión a RNA en cloroplasto (Tabla 3). Éstas se caracterizan por tener dos dominios de unión a RNA y motivos auxiliares de carácter ácido hacia la región amino terminal (Fukami *et al.*, 1993; Ohta *et al.*, 1995) o ricos en glicina (Ludevid *et al.*, 1992; Ni *et al.*, 2000; Ohta *et al.*, 1995) o serina (Ohta *et al.*, 1995). Otra característica de las RNPs de cloroplasto es que se encuentran codificadas en el núcleo. Es por eso que tienen un péptido de tránsito que les permite ser transportadas a ese organelo. Este péptido es removido al entrar al cloroplasto, generando la proteína madura y funcional (Smeekens *et al.*, 1990).

Algunas de las RNPs que se han estudiado con más detalle son aquellas que se unen a los extremos 3' no traducibles (3' UTR) de mRNAs cloroplásticos. Entre éstas están la 100RNP, p67, 55RNP, 33RNP, 31RNP y 29RNP que se encuentran formando un complejo de alto peso molecular encargado del procesamiento de los mRNAs cloroplásticos (Schuster y Gruissem, 1991; Toledo, 1998). Aunque aún se desconoce la función de algunas proteínas de este complejo (Schuster y Gruissem, 1991; Hayes *et al.*, 1996) se ha sugerido que tienen cierta similitud con el degradosoma de *Escherichia coli*, complejo encargado de la degradación de mensajes (Reinhard, 1999).

Tabla 3. RNP's identificadas en cloroplastos de plantas superiores. Funciones propuestas para las distintas RNPs aisladas de cloroplastos (Sugita y Sugiura, 1996; Hirose y Sugiura, 2001).

PROTEÍNA	ESPECIE	CARACTERÍSTICA Y FUNCIÓN PROPUESTA
CP28, CP29A, CP29B, CP31, CP33.	<i>Nicotiana sylvestris</i>	Unión preferencial a poli(G), poli(U), proteínas de unión generalizada a RNA presentes como complejos de 20-30s. La cp31 participa en la edición de mRNA de cloroplastos.
CP-RNP30, CP-RNP31	<i>N. plumbaginifolia</i>	Corresponden a las cp29A y cp29B de <i>N. sylvestris</i> .
CP29, CP31, CP33	<i>A. thaliana</i>	Homólogas a las de <i>Nicotiana sylvestris</i> Función desconocida
RNP-T	<i>A. thaliana</i>	
ATRBP31, 33	<i>A. thaliana</i>	
CRBP	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	
28RNP	<i>Spinacia. oleracea</i>	Procesamiento de extremos 3'UTR de mRNA.
24RNP	<i>S. oleracea</i>	Desconocida
NBP	<i>Zea mays</i>	Aislada como proteína de unión a DNA
RNP1 de frijol	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Proteína de unión a AG-1; unión específica a secuencias de cadena sencilla ricas en T.

Existe un grupo de RNPs (cp28, cp29A, cp29B, cp31 y cp33) de tabaco que son proteínas muy abundantes en el estroma. Tienen dos dominios de unión a RNA (CS-RBDs), y cuentan con un dominio ácido amino-terminal (AD) (Hirose y Sugiura, 2001). Estas RNPs se asocian con varios RNAs, tales como mRNA, pre-tRNA y pre-rRNA, lo que sugiere que se encuentran participando en distintos eventos como el procesamiento, estabilidad o almacenamiento de mRNAs (Nakamura *et al.*, 1999).

Se ha demostrado que la cp31 es un factor esencial en la edición de algunos mensajeros cloroplásticos y que para ello su dominio ácido resulta indispensable. Esta RNP se encuentra de manera muy abundante, casi en cantidades iguales a las proteínas ribosomales cloroplásticas. Pero la cantidad de mensajeros que presentan sitios de reconocimiento para la edición es limitada. Se ha sugerido que la cp31

participa también en otros eventos postranscripcionales (Hirose y Sugiura, 2001). Por otro lado la cp31, homóloga a la 28RNP de espinaca, cuando es sustraída de un extracto de procesamiento cloroplástico, no afecta la tasa en el correcto procesamiento del 3' UTR de mensajeros de tabaco, contrario a lo que sucede con su homóloga en espinaca, la 28RNP, que parece estar determinando el sitio correcto de procesamiento del 3' UTR (Nakamura *et al.*, 1999).

3.2. Las RNPs cloroplásticas de *Arabidopsis thaliana*.

En *Arabidopsis thaliana* se encontraron tres proteínas de unión a RNA homólogas a las cpRNPs de *N. plumbaginifolia*. Los genes correspondientes fueron aislados de una biblioteca genómica de *A. thaliana* utilizando como sondas cDNA correspondientes a las cp29, cp31 y cp33 de tabaco. Estas proteínas están codificadas en genes nucleares los cuales presentan una sola copia y están constituidos de cuatro exones y tres intrones (Ohta *et al.*, 1995).

Las proteínas cp29, cp31 y cp33 de *A. thaliana* (Figura 2), al igual que sus homólogas en tabaco, presentan dos dominios de unión a RNA, un dominio ácido en el extremo amino-terminal y un péptido de tránsito. La cp29 es un polipéptido de 334 aminoácidos (aa), cuyos primeros 66 aa son ricos en serina y treonina, confiriéndole una carga neta positiva característica de los péptidos de tránsito (Smeeckens *et al.*, 1990). La proteína madura posee 268 aa y una masa de 28.3 kDa. Los primeros 32 a.a. de la proteína madura son ricos en ácidos glutámico y aspártico (DA). Posee también dos dominios consenso de unión a RNA (CS-RBD I y II) y entre estas secuencias una zona espaciadora rica en glicina y serina (Ohta *et al.*, 1995). Es muy parecida a la cp29 de tabaco. La cp31 posee 314 aa, de los cuales 76 corresponden al péptido de tránsito, la proteína madura de 238 a.a. tiene una masa molecular aproximada de 26.3 kDa. La secuencia del péptido maduro tiene un 62% de identidad con la proteína cp31 de tabaco; el dominio ácido es similar al de la proteína 28RNP de espinaca (43% de identidad). Posee dos dominios de unión a RNA y una zona espaciadora pequeña (Ohta *et al.*, 1995). La cp33 es un polipéptido que tiene 321 a.a. con un péptido de tránsito de 73 aa, por lo que la proteína madura consiste en 256 a.a. y presenta una masa molecular de 27.8 kDa; la región espaciadora de esta proteína es similar a la de

la cp31 (Ohta *et al.*, 1995). Los tamaños de los transcritos de los genes de la cp29, cp31 y cp33 son de 1.5 kb, 1.2 kb y 1.3 kb, respectivamente (Ohta *et al.*, 1995).

cp29										
1	SAFNPKSLPL	CVSRPASVSV	LPPSLSFKLH	SDHLVSIFAS	SALKCSSPAE	YPSRFVRNVA				
61	VSSDFEVEED	DMFADGDDSA	PVERNSFSPD	LKLFVGNLSF	NVDSAQLAQL	FESAGNVEMV				
121	EVIYDKVTGR	SRGFGFVTMS	TAAEVEAAAQ	QFNGYEFEGR	PLRVNAGPPP	PKREESFSRG				
181	PRSGGYGSER	GGGYGSERGG	GYGSERGGGY	GSQRSGGGYG	GSQRSSYGSG	SGSGSGSGSG				
241	NRLYVGNLSW	GVDDMALENL	FNEQGVVEA	RVIYDRDSGR	SKGFGFVTLS	SSQEVQKAIN				
301	SLNGADLDGR	QIRVSEAEAR	PPRGQF							
cp31										
1	KPLAMADSSS	STIFSHSPIS	STISSRIRS	SSVLLTGRI	NLPLSFSRVS	LSLKTKTHLK				
61	KSPFVSVFAQ	TSDWAEEGGE	GSVAVEETEN	SLESQDVSPG	DESEGDVSEG	AVSERAEFPE				
121	PSEEAQLFVG	NLAYDVNSQA	LAMLFQAGT	VEIAEVIYNR	ETDQSRGFGF	VTMSSVDEAE				
181	TAVEKFNRYD	LNGRLLTVNK	AAPRGSRPER	APRVYEPAFR	VYVGNLPWDV	DNGRLEQLFS				
241	EHGKVVEARV	VYDRETGRSR	GFGFVTMSDV	DELNEAISAL	DGQNLGRAI	RVNVAERPP				
301	RRGY									
cp33										
1	AVAVSAAATA	SSAATFNPLL	SSHNSQLFY	RFTPFSFKLV	ANCPNPLILH	SNIRRHFFC				
61	AAETEASSAD	DEIQASVEEE	EEVEEEGDEG	EEVEEEKQT	TQASGEWRL	YVGNLPYTIT				
121	SSELSQIFGE	AGTVVDVQIV	YDKVTDNRSG	FGFVTMGSIE	EAKEAMQMFN	SSQIGGRTVK				
181	VNFPEVPRGG	ENEVMRTKIR	DNNRSYVDSP	HKVYAGNLGW	NLTSQGLKDA	FGDQPGVLGA				
241	KVIYERNTGR	SRGFGFISFE	SAENVQSALA	TMNGVEVEGR	ALRLNLASER	EKPTVSPPSV				
301	EEGETEEASL	ESNEVLSNVS	A							

Figura 2. Secuencia de aminoácidos de las proteínas de unión a RNA de cloroplasto de *Arabidopsis thaliana*. En negritas se representan las regiones de unión a mRNA en **negrita y subrayado** los dominios de unión a mRNA y en **subrayado** el dominio ácido (Ohta *et al.*, 1995).

4. *Arabidopsis thaliana* como modelo.

Arabidopsis thaliana (Figura 3) es una pequeña planta que se emplea ampliamente como modelo genético desde los 80's (Meyerowitz, 1995). Es miembro de la familia *Brassicaceae*, que incluye especies de interés comercial como la col, el rábano y brócoli.

Arabidopsis thaliana no es de importancia agronómica, mas bien ofrece importantes ventajas para la investigación básica en genética de plantas y biología molecular. Dichas ventajas son:

- Presenta un ciclo de vida corto, aproximadamente seis semanas desde la germinación.
- Se cultiva fácilmente en poco espacio y produce muchas semillas.
- Posee un genoma pequeño, secuenciado completamente.
- Existen una gran cantidad de líneas mutantes y otros recursos genéticos.
- Se transforma eficientemente con *Agrobacterium tumefaciens*.
- Se conoce bien el mapa físico y genético de sus cinco cromosomas.
- Su genoma está completamente secuenciado.
- Existe una amplia cantidad de recursos accesibles a través de Internet.



Figura 3. *Arabidopsis thaliana*.

4.1. La mutante cla 1-1.

Las mutantes han sido empleadas como herramientas para entender la función de genes desde hace mucho tiempo. Existen algunas plantas mutantes que tienen afectado el desarrollo del cloroplasto y muy pocas son las que están afectadas en los eventos iniciales en la biogénesis del organelo (Taylor, 1989; León *et al.*, 1998). La mutante de *Arabidopsis thaliana* cla1-1, obtenida a partir de la inserción de T-DNA en el gen denominado CLA1 que codifica la enzima 1-deoxy-D-xylulose-5-fosfato sintetasa, que interviene en la síntesis de isoprenoides (Estévez *et al.*, 2000), presenta un fenotipo albino y sus plastidios detienen su desarrollo en etapas tempranas. Éstos son pequeños y no tienen membranas tilacoidales desarrolladas, características que los hacen parecerse mucho a los proplastidios. El fenotipo albino resulta de un bloqueo en la vía 2-C-metil-D-erytritol-4-fosfato para la síntesis de isoprenoides que parece afectar el desarrollo de los cloroplastos (Estévez *et al.*, 2000). La mutante cla 1-1 se comporta como las del tipo silvestre en la etiolación y produce antocianinas, además de que en ausencia de luz las mutantes presentan un patrón de crecimiento skotomorfogénico normal, lo que indica que las señales de transducción de luz no están alteradas. Por otro lado se encuentran niveles normales de expresión de algunos genes cloroplásticos como *psaB* y otros cloroplásticos codificados en núcleo, como el caso de CPN60 β . Lo que indica que no se ve alterada la expresión de genes cloroplásticos.

El fenotipo albino mutante es heredado como recesivo en una proporción 3:1 en condiciones no selectivas. Las plantas cultivadas en medio con sacarosa producen los primordios florales a las cinco semanas, los cuales nunca llegan a madurar. Estos son parecidos a los de plantas silvestres cultivadas en oscuridad (Mandel, 1996). Bajo condiciones de cultivo selectivas con kanamicina, el fenotipo mutante y el marcador Km (gen de resistencia a kanamicina), incorporado con la inserción del T-DNA, segregan en 1:2:1 (Albinas Km_r : Km_r wt : Km_s wt), es decir, que de 100 semillas sembradas se obtienen en promedio 50% con fenotipo silvestre y resistentes al antibiótico, 25% del fenotipo albino resistentes a Km y 25% del fenotipo silvestre sensible al antibiótico.

Por lo anteriormente descrito, para el caso del presente trabajo, la mutante *cla1-1* proporciona un buen modelo para la obtención de grandes cantidades, de tejido rico en plastidios indiferenciados: proplastidios.

IV. OBJETIVOS

Objetivo general

Analizar la expresión de las proteínas cp29, cp31 y cp33 y de sus genes correspondientes, *athcp29*, *athcp31* y *athcp33*, en diferentes tipos de plastidios de *Arabidopsis thaliana*.

Objetivos particulares

- Determinar el nivel de proteína cp29, cp31 y cp33 presente en tejidos de *Arabidopsis thaliana* con proplastidios y cloroplastos de distintas edades, en tejidos con amiloplastos, etioplastos y cloroplastos senescentes.
- Determinar los niveles de mRNAs correspondiente a los genes *athcp29*, *athcp31* y *athcp33* en tejidos de *Arabidopsis thaliana* que contienen proplastidios y cloroplastos.

V. HIPÓTESIS

Con base en los antecedentes, se propone que:

- Se encontrará acumulación de las proteínas cp29, cp31 y cp33 en tejidos expuestos a luz que contengan proplastidios y cloroplastos, menor acumulación en cloroplastos senescentes y no se encontrará esta proteína en tejidos que contengan amiloplastos y etioplastos.
- Se encontrará acumulación de mRNA de las cp29, cp31 y cp33 de *Arabidopsis thaliana* en tejidos expuestos a luz que contengan proplastidios y cloroplastos.

VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

El primer requisito era contar con el material biológico: tejido vegetal con distintos tipos de plastidios. Se cultivaron plantas silvestres y mutantes cla 1-1 de *Arabidopsis thaliana*, donadas por la Dra. Patricia León del Instituto de Biotecnología de la UNAM, separando el tejido aéreo de las raíces para uso posterior. Para obtener tejidos con proplastidios se cosecharon plantas mutantes cla 1-1 de *Arabidopsis thaliana*. Para la obtención de cloroplastos se sembraron plantas silvestres. Las raíces de estas plantas se usaron para obtener el tejido con amiloplastos. Los etioplastos se obtuvieron de cultivar y cosechar plantas silvestres que crecieron en la oscuridad y finalmente el tejido que contiene cloroplastos senescentes se obtuvo de plantas silvestres que crecieron en luz y fueron pasadas a oscuridad durante dos semanas.

Para determinar los niveles de mRNA requería de varios pasos: amplificar los genes *athcp29*, *athcp31* y *athcp33* clonados en pBS, en la cepa de *E. coli* XL1 Blue. Estos cDNAs fueron amplificados, aislados y empleados como sondas, mediante el marcaje con α -dCT³²P por la técnica de Random primer. El siguiente paso fue realizar extracciones de RNA total de los tejidos colectados, separarlo en geles desnaturizantes, transferirlos a una membrana de nylon y realizar ensayos tipo Northern blot.

Para determinar la presencia de las proteína cp29, cp31 y cp33 se usaron extractos de proteínas solubles de tejidos de *Arabidopsis thaliana* con diferentes tipos de plastidios. Las proteínas fueron separadas en un gel de poliacrilamida desnaturizante y transferidas a membranas de PVDF. Las proteínas fueron detectadas empleando anticuerpos policlonales que previamente habían sido producidos en huevos de gallina en contra de la cp29 y que también identificaban a la cp31 y cp33.

Los cDNAs de la *athcp29*, *athcp31* y *athcp33* que fueron donados por el Dr. Masagiro Sugiura del Center for Gene Research de Nagoya Japón y los anticuerpos fueron producidos en el Depto. de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Obtención de tejidos con distintos tipos de plastidios

4.1. Esterilización y siembra de semillas.

Antes de la siembra, las semillas deben de ser esterilizadas para evitar la contaminación. El proceso de esterilización es el siguiente:

Lavar las semillas con isopropanol por un minuto.

1. Pasarlas a una solución de hipoclorito de sodio (cloralex) 50%, 0.05% Tween en H₂O estéril y agitar durante 5 min.
2. Enjuagarlas con H₂O estéril tres veces.
3. Suspenderlas en una solución de agarosa estéril al 0.5% para poder controlar la cantidad de semillas que se vierten por gota, durante la siembra.

Las plantas de *Arabidopsis thaliana* del tipo silvestre y de la mutante cla1-1 se siembran en cajas de Petri con medio Murashige y Skoog (Medio MS) (Apéndice 1). Las plantas mutantes cla1-1 se siembran en medios MS selectivos que contienen Kanamicina (Apéndice 1) y complementados con 2% de sacarosa (Mandel, 1995). Se prepara el medio MS, se esteriliza en autoclave y se vierte dentro de una campana de flujo laminar en cajas Petri estériles. Se toman las semillas suspendidas en agarosa y se siembran gota a gota, vertiéndolas en las cajas Petri, procurando que quede el suficiente espacio entre cada semilla (0.5 cm de radio) para que no se amontonen al crecer. Esto evita que se genere estrés en las plantas y que no se produzcan falsos positivos, por agotamiento de antibiótico. Inmediatamente después, las cajas se pasan a 4 °C por tres días, sin luz, para someter a las semillas a un proceso de vernalización.

4.2. 4.2. Condiciones de cultivo.

Después de la vernalización, las cajas con semillas se pasan a cámaras de crecimiento con las condiciones de 8 h de luz /16 h de oscuridad, temperatura 25 – 27 °C y humedad controlada. Las plantas de ambos fenotipos se mantienen en crecimiento por un mes en estas condiciones. Se realizan tomas de tejido aéreo (roseta) cada semana (Tabla 4). El tejido se recolecta y congela inmediatamente después de ser cortado. Se guarda a –70 °C. Este proceso se debe realizar en el menor tiempo posible para evitar la degradación de proteínas y RNA.

Para obtener etioplastos, las semillas se ponen a germinar en oscuridad total dentro de las cámaras durante 15 días y bajo las mismas condiciones de temperatura y humedad, al término del período son cosechadas. Para obtener cloroplastos senescentes, plantas con 15 días de crecimiento normal se pasan a oscuridad por otros 15 días y posteriormente se cosechan.

Tabla 4. Tipos de plastidios presentes en los diferentes tejidos vegetales de *Arabidopsis thaliana*.

TEJIDO	TIPO DE PLASTIDIO
Aéreo, de plantas en fotoperíodo de 8 h luz/16 h oscuridad	Cloroplastos
Aéreo, de plantas cultivadas en oscuridad.	Etioplastos
Raíz	Amiloplastos
Aéreo, de plantas pasadas a oscuridad.	Cloroplastos senescentes
Aéreo, de la mutante <i>cla1-1</i> en fotoperíodo 8 h luz/16 h oscuridad.	Proplastidios

2. Extracción de proteínas de tejidos vegetales

1. Preparar amortiguador de extracción (Apéndice 2). Añadir los inhibidores de proteasas y el β -mercaptoetanol. Emplear una proporción de tejido: amortiguador de extracción 1:1.5 (p:v).
2. Enfriar los morteros a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y preparar recipientes con hielo y nitrógeno líquido.
3. Pesar 200 mg de tejido.
4. Colocar el tejido en el mortero y agregar nitrógeno líquido. Hacer la molienda con la mano del mortero hasta obtener un polvo fino. Mantener el tejido congelado durante todo el proceso de molienda, agregando nitrógeno líquido las veces que sean necesarias.

5. Agregar el amortiguador de extracción frío cuando se tenga un polvo fino y aún congelado.
6. Dejar descongelar lentamente. Inmediatamente después colocar el extracto en un tubo eppendorf frío y centrifugar en una microcentrífuga a 5,000 rpm 10 s a 4 °C.
7. Recuperar el sobrenadante y ponerlo en un tubo limpio, etiquetado y previamente enfriado.
8. Reservar alícuotas de 10 μL del extracto en otros tubos para realizar la medición de proteínas.
9. Congelar el extracto con nitrógeno líquido y almacenar a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

3. Cuantificación de proteínas

Es necesario medir la cantidad de proteínas de los extractos para manejar la misma cantidad de muestra en los diferentes experimentos. La medición se hace con el reactivo de Bradford (BioRad, Cat. 500-0006) que da una reacción colorida que se mide a 595 nm.

La cuantificación se realiza de la siguiente manera:

1. Preparar una curva estándar empleando una solución de 1 mg/mL de BSA.

μL BSA (1 mg/mL)	μL de agua
1	799
3	797
7	793
10	790
12	788

2. Preparar las muestras de extracto, haciendo tres puntos para cada una, como sigue:

μL de muestra	μL de agua
1	799
2	798
3	797

3. Una vez que se han preparado los tubos de los estándares y de las muestras, agregar 200 μL del reactivo de Bradford a cada uno y agitar perfectamente.
4. Leer en el espectrofotómetro a 595 nm.
5. Graficar los resultados para determinar la linealidad del ensayo.
6. Hacer la regresión lineal de los puntos de la curva estándar. Con la ecuación obtenida y la absorbancia promedio de cada muestra, calcular los μg de proteína por μL de muestra, utilizando la fórmula: $A = C m + b$
Donde:

A = absorbancia.

C = concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)

m = pendiente

b = ordenada al origen

4. Determinación de los niveles de las proteínas cp29, cp31 y cp33.

4.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (PAGE-SDS).

1. Preparar geles con separadores de 1 mm y con la composición correspondiente, especificada en los siguientes cuadros (Apéndice 3).

Gel separador

	% de acrilamida	
	12%	15%
Agua	1.4 mL	1.0 mL
Amortiguador separador	1.0 mL	1.0 mL
Acrilamida 30%	1.6 mL	2.0 mL
Persulfato de amonio 20%	25 μL	25 μL
TEMED	2.5 μL	2.5 μL

Gel apilador

Agua	1 mL
Amortiguador apilador	444 μ L
Acrilamida 30%	300 μ L
Persulfato de amonio 20%	20 μ L
TEMED	5 μ L

2. Colocar las muestras con cantidades de proteína iguales en tubos eppendorf y agregar amortiguador de carga 5X para tener una concentración final 1X (Apéndice 3).
3. Hervir las muestras durante 5 min.
4. Cargar las muestras en los pozos de los geles, previamente montados en el casting del equipo Mini-protean II (BioRad). Colocarlo en el tanque con amortiguador de corrida a una concentración 1X (Apéndice 3).
5. Correr las muestras a 20 mA hasta que se apilen y entren al gel separador. Entonces correr a 100 V. El tiempo de corrida depende de la concentración del gel y de las muestras. Al finalizar la electroforesis, los geles pueden ser teñidos con azul de Coomassie durante 20 min y lavados con solución fijadora y desteñidora (Apéndice 3), o ser transferidos a membranas de PVDF o nitrocelulosa para llevar a cabo el análisis por Western blot.

4.2. Transferencia de proteínas a membranas.

1. Preparar el amortiguador de transferencia (Apéndice 4) y mantenerlo en refrigeración hasta su uso. Añadir el metanol al momento de utilizar el amortiguador.
2. Después de la electroforesis, enjuagar el gel en amortiguador de transferencia para preequilibrarlo.
3. Cortar seis trozos de papel filtro Whatmann 3MM de 7 x 9 cm y un trozo de membrana PVDF de 8.5 x 6 cm. Hidratar la membrana añadiendo metanol durante 5 segundos y después añadir agua hasta que la membrana se humedezca completamente.

4. Colocar el amortiguador de transferencia frío en una charola, dentro de la que se ensambla la transferencia. Colocar el cassette (gel holder) en el recipiente y sobre éste: una fibra, tres cuadros de papel filtro, la membrana, el gel, tres cuadros de papel filtro, una fibra. Cerrar el cassette y colocarlo en el electrodo mini Trans-Blot (Bio-rad) en la orientación correcta para que se lleve a cabo la transferencia.
5. Instalar el electrodo en el tanque del amortiguador. Llenar éste hasta la mitad con amortiguador de transferencia e introducir un agitador magnético. Colocar la unidad de enfriamiento Bio-Ice (Bio-rad), previamente congelada, dentro del tanque.
6. Hacer la electrotransferencia a voltaje constante de 100 voltios y 250 mA, durante 1 h con agitación.
7. Después de la transferencia, enjuagar la membrana con TBS-T (0.1 %) para quitar la acrilamida pegada a la membrana (Apéndice 4).

4.3. Anticuerpos utilizados en la inmunodetección de la cp29.

Para la detección de la proteína cp29 en extractos de *A. thaliana* se emplearon dos tipos de anticuerpos. Los anticuerpos contra la cp29 fueron producidos por miembros del grupo de la Dra. Loza-Tavera, en las instalaciones del bioterio del Depto. de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología. El procedimiento empleado se describe brevemente a continuación: el gen de la *athcp29* de *A. thaliana* fue clonado en el vector pQE30 sin la secuencia del péptido de tránsito y con una etiqueta de histidinas en el extremo amino terminal, el gen fue clonado bajo el promotor inducible de *lacZ* (Barrios, 2001). Con este plásmido se transformó la cepa M15 de *E. coli* y se produjo cp29 recombinante, se purificó empleando una columna de níquel y se corrió en un PAGE-SDS. A partir de este gel se cortó la banda correspondiente a esta proteína, para evitar la presencia de alguna proteína contaminante y se inyectó en gallinas. Los anticuerpos contra la cp29 se purificaron por un procedimiento de precipitación diferencial, de los huevos de las gallinas inoculadas. Estos anticuerpos fueron titulados y almacenados en volúmenes pequeños a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Rodríguez, V. No publicado).

El otro tipo de anticuerpo utilizado para este análisis fueron los que se desarrollaron en contra de la 24RNP de espinacas (Robles, 2000). Estos anticuerpos fueron producidos en contra de proteína recombinante, de manera semejante a lo descrito para la cp29. En este caso fueron desarrollados en conejas.

4.4. Inmunodetección de las proteínas.

1. Bloquear la membrana en TBS con 5% de leche descremada durante 1 h a temperatura ambiente y con agitación.
2. Agregar el primer anticuerpo (anti-cp29 a una dilución de 1:15,000 o el anti-24RNP a una dilución de 1:15,000 diluido en TBS con leche al 5%. Incubar a 37 °C con agitación durante 2 h o toda la noche (14 h) a 4° C.
3. Quitar el primer anticuerpo y lavar la membrana con 20 mL de TBS-T. Hacer un lavado rápido y dos lavados de 15 min con agitación.
4. Añadir el segundo anticuerpo (anti-IgY para anti-cp29 o anti-IgG para anti-24RNP acoplado a peroxidasa de rábano) diluido 1:2,500 en TBS y leche al 5%. Incubar durante 2 h a temperatura ambiente.
5. Eliminar el segundo anticuerpo y hacer tres lavados a la membrana con TBS-T. Un lavado rápido y los otros dos de 15 min cada uno con agitación.

Revelar por medio de una reacción de quimioluminiscencia empleando los reactivos de ECL (Amersham Pharmacia Biotech RPN 2106), siguiendo las instrucciones del fabricante.

5. Preparación de sondas

5.1. Descripción de los cDNAs empleados como sondas.

Los genes *athcp29*, *athcp31* y *athcp33* que codifican a la cp29, cp31 y cp33 respectivamente de *A. thaliana* fueron donados por el Dr. Masagiro Sugiura del Center for Gene Research de Nagoya Japón (Ohta *et al.*, 1995). Estos genes se obtuvieron de una biblioteca de cDNA, por lo que contienen solo las secuencias codificadoras. Están clonadas en el plásmido Bluescript (pBS-KS) (Figuras 4 y 5)

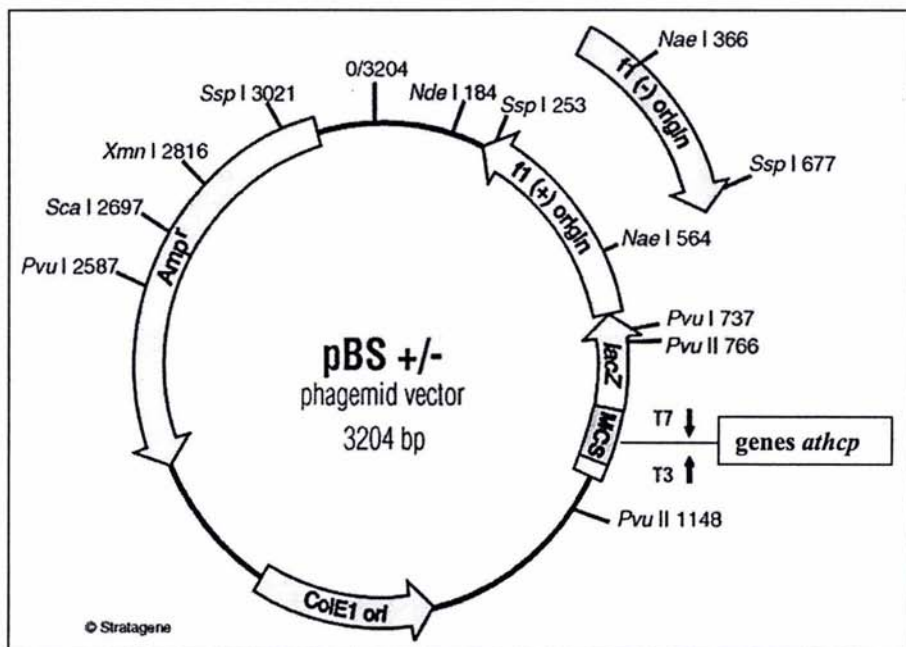


Figura 4. Vector pBluescript. En este vector están clonados los genes completos de las tres RNPs de *Arabidopsis thaliana*. Este vector tiene un tamaño de 2.96 Kb y con los genes clonados un poco más de 4 Kb (Ohta *et al.*, 1995).

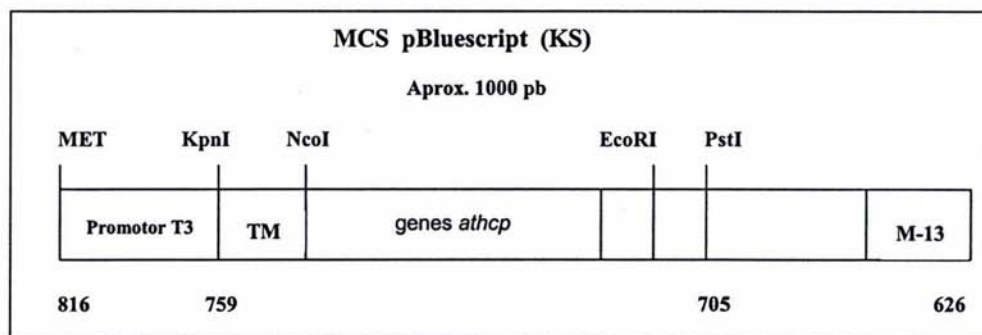


Figura 5. Mapa del sitio de clonación de los genes *athcp*'s introducidos en un derivado de pBS. Los genes *athcp*'s se encuentran clonados en el sitio *EcoRI* de un pBluescript modificado, al que se le había adicionado una secuencia líder TMV que poseía un sitio de corte *NcoI*. Los números indican el número de pares de bases del vector (Ohta *et al.*, 1995).

Los tamaños de los genes son: 1051pb para *athcp29*, 1035 pb para *athcp31* y 1066 pb para *athcp33*. Estas secuencias incluyen el péptido de tránsito. Los genes se encuentran clonados entre los sitios *NcoI* y *EcoRI* en pBS (Ohta *et al.*, 1995) (Figura 4). Se emplearon células transformadas de las cepas de *E. coli* XL1-Blue para la propagación de los plásmidos y así amplificar los genes (Barrios, 2001).

5.2. Extracción rápida de DNA plasmídico.

Este método produce DNA de alto grado de pureza y rendimiento (método QIAPREP, QIAGEN INC., 1995).

1. Seleccionar una colonia aislada de la cepa de interés y cultivar en 5 mL de medio LB durante toda la noche en condiciones normales (37 °C, con agitación constante). Este cultivo puede tener máximo 16-18 h de crecimiento.
2. Colectar las células por centrifugación a 13,000 rpm durante 5 min en una microcentrífuga. Conservar la pastilla y desechar el sobrenadante. Resuspender la pastilla en 250 μ L de amortiguador P1, cuidando que no queden acumulaciones de bacterias al resuspender.
3. Adicionar 250 μ L de amortiguador P2 e invertir el tubo 4-6 veces para mezclar. La solución debe verse ligeramente clara y viscosa. No dejar pasar más de 5 min en esta solución.
4. Adicionar 350 μ L de amortiguador N3 e invertir el tubo suavemente 4-6 veces. Evitar la precipitación localizada; en este punto la solución se vuelve oscura y muy viscosa, se pueden llegar a formar grumos.
5. Centrifugar el tubo durante 10 min a 14,000 rpm a 4° C, después de lo cual se obtiene una pastilla blanca. Mientras se lleva a cabo la centrifugación una columna Qiaprep™ se coloca en un tubo de colecta de 2 mL.
6. El sobrenadante del paso anterior se aplica a la columna y se centrifuga a 14,000 rpm durante 60 s. Descartar el eluato.
7. Lavar la columna por adición de 500 μ L de amortiguador PB. Centrifugar nuevamente durante 60 s. Descartar de nuevo el sobrenadante. Este paso se repite una vez más a fin de obtener un plásmido más limpio.

8. Lavar nuevamente la columna esta vez con 750 μL de amortiguador PE y repetir la centrifugación 60 s. El volumen de elución se descarta, la columna se centrifuga por 1 min adicional a fin de retirar el exceso de amortiguador.
9. La columna se coloca dentro de un tubo eppendorf limpio y estéril de 1.5 mL. Para eluir el DNA se adicionan 50 μL de H_2O desionizada estéril al centro de la columna, permitiendo que permanezca durante 1 min. Se centrifuga finalmente 1 min más para recolectar el DNA en el tubo limpio. Éste se etiqueta y se conserva a -20°C , el tiempo que sea necesario.

5.3. Liberación del inserto por reacciones de restricción (Sambrook *et al.*, 1989).

Para liberar el inserto del plásmido es necesario realizar el corte del DNA en los sitios de restricción en los cuales se encuentra clonado el gen en el plásmido (Figura 5). Por lo tanto, se usaron las enzimas *EcoRI* y *NcoI*, ya que los genes *athcp*'s fueron clonados en esos sitios. Para llevar a cabo la restricción de DNA se debe partir de una muestra pura. Determinar el volumen total de la reacción tomando en cuenta el volumen de DNA que se requiere restringir, así como el volumen de enzima que no debe exceder el 10% del volumen total y el necesario para que el amortiguador quede 1X. Las enzimas de restricción y sus amortiguadores son muy delicados por lo que se deben usar rápidamente. El amortiguador se debe descongelar en hielo y la enzima debe estar todo el tiempo a -20°C para conservar su actividad intacta.

1. En un tubo eppendorf limpio y estéril se agrega el DNA.
2. Se adiciona el volumen necesario de amortiguador para que su concentración final sea de 1X.
3. Se agrega el volumen de agua necesario para ajustar la reacción.
4. Las enzimas se agregan al final, casi siempre se utiliza 1 μL de enzima (10 U/ μL). Ésta se toma con una punta nueva y estéril para evitar contaminación.
5. Incubar por 4 h a 37°C o a la temperatura óptima de la enzima en uso.

Después de la restricción, se analiza una alícuota por electroforesis en gel de agarosa, comparando la muestra contra un marcador de peso molecular, para comprobar que el fragmento de DNA obtenido corresponde al tamaño esperado del inserto.

5.4. Electroforesis de DNA.

Para comprobar que la extracción del plásmido, de las células bacterianas, fue exitosa, es necesario realizar una electroforesis del DNA en un gel de agarosa al 1.5 %.

1. Se monta el sistema para preparar el gel de agarosa, cuidando que esté perfectamente nivelado. Se selecciona el peine de tamaño adecuado, de acuerdo al número y volumen de las muestras.
2. Se prepara el gel al 1.5 % de agarosa:
 - a) Agarosa 0.38 g
 - b) Agua bidestilada y desionizada 25 mL
 - c) Calentar en un matraz con tapón de algodón hasta disolver la agarosa.
 - d) Al entibiarse agregar 0.5 mL de TAE 50X (Apéndice 5).
 - e) Disolver perfectamente bien y al enfriarse agregar bromuro de etidio a la concentración adecuada.
3. Vaciar la agarosa en el sistema montado en el paso 1. Inmediatamente después se coloca el peine y se espera a que gelifique por completo.
4. Emplear una cámara para minigeles previamente enfriada a 4°C que contenga amortiguador de corrida TAE 1X (Apéndice 5) frío.
5. Preparar las muestras con amortiguador de carga; un volumen total de 8 μ L de muestra más dos de amortiguador de carga quedando a una dilución 1X (Apéndice 5).
6. Colocar las muestras de DNA preparadas en los pozos de los geles y correr a 60 V por dos horas hasta que el azul de bromofenol llegue a tres cuartas partes del gel, para evitar que pequeños fragmentos de DNA salgan del gel.

Al término de la electroforesis se observa en una lámpara de luz UV de baja intensidad para evitar que el DNA se dañe.

5.5. Purificación de DNA a partir de geles de agarosa (QIAGEN INC., 1995).

1. Correr un gel con las muestras que se deseen purificar, de acuerdo a la técnica anterior. Se debe conocer perfectamente el orden en el que se cargan las muestras para evitar confusión.
2. Todo el material que se va a emplear debe ser estéril y de preferencia nuevo.
3. Pesar el número de tubos eppendorf correspondiente al número de bandas que se va a purificar. El peso se registra para cada tubo por separado.
4. Teñir el gel con la menor cantidad de bromuro de etidio posible y revelar con una lámpara de luz UV de longitud de onda de 260 nm, de preferencia en un cuarto oscuro. Seleccionar la banda de interés, cortarla con una navaja. Es preferible hacerlo con un poco más de agarosa para recuperar el máximo posible de DNA, siempre y cuando no haya otra banda presente que contamine la muestra de interés.
5. Colocar la banda cortada en el tubo que le corresponda y pesar todo junto (tubo y banda). Al valor resultante restar el peso inicial del tubo; este valor corresponde al peso del fragmento de agarosa con DNA.
6. Adicionar la cantidad correspondiente de amortiguador QX1 para cada tubo de acuerdo a lo estipulado en el protocolo del fabricante.
7. Resuspender la resina QIAEX II empleando un vórtex durante 30 s.
8. Adicionar QIAEX II de acuerdo a la siguiente información y mezclar:
 - $\leq 2 \mu\text{g}$ DNA agregar 10 μL de resina.
 - 2-10 μg DNA agregar 30 μL de resina.
9. Incubar la mezcla a 50°C durante 10 min. Mezclar todo durante 2 min para mantener la resina en suspensión y que actúe bien.
10. Revisar el pH, pues la resina es más eficiente a $\text{pH} \leq 7.5$, por lo que si el pH de la disolución es >7.5 se debe agregar 10 μL de acetato de sodio 3 M a pH 5 y revisar el pH de nuevo. Si se tuvo que equilibrar el pH se debe incubar por 10 min más a temperatura ambiente.

11. Centrifugar la muestra 30 s a máxima velocidad y remover cuidadosamente el sobrenadante con una punta de micro pipeta.
12. Lavar con 500 μ L de amortiguador QX1 la pastilla obtenida. Resuspender con un vórtex y centrifugar por 30 s. Remover el sobrenadante con una punta de micropipeta.
13. Lavar con amortiguador PE la pastilla dos veces. Resuspender la pastilla con agitación usando un vórtex. Centrifugar 30 s y remover el sobrenadante.
14. Abrir el tubo cerca del mechero para que se seque al aire; esto lleva 10-15 min o hasta que la pastilla se vuelve blanca.
15. Para eluir el DNA se agregan 20 μ L de Tris HCl pH 8.5 o agua desionizada estéril. La pastilla se resuspende empleando un vórtex y se incuba acorde a lo siguiente:
 - Para fragmentos DNA \leq 4 Kb, a temperatura ambiente durante 5 min.
 - Para fragmentos DNA 4-10 Kb, a 50 ° C durante 5 min.
 - Para fragmentos DNA $>$ 10 Kb, a 50 ° C durante 10 min.

Centrifugar el tubo durante 30 s. El sobrenadante que contiene el DNA puro se transfiere a un segundo tubo limpio y estéril, se rotula perfectamente y se guarda a -20 °C.

5.6. Marcaje de insertos con (α - 32 P) dCTP mediante Random Primer.

Los insertos liberados y purificados fueron marcados con (α - 32 P) dCTP por medio del sistema Random primer extension de Invitrogen

1. El isótopo radioactivo α -dCTP 32 P (actividad específica = 3000-6000 Ci/mmol, con una concentración de 20 μ m Ci/mL) se descongela en un lugar especial para trabajar con radioactividad y con las respectivas precauciones.
2. El inserto a marcar se desnaturaliza en baño María por 10 min.

En un tubo de microcentrífuga se prepara una mezcla de los siguientes componentes:

50-100 ng de inserto desnaturalizado

6 μ l de amortiguador

6 μ l de mezcla de nucleótidos no radiactivos dATP, dGTP, dTTP

Agua estéril para completar un volumen final de 30 μ L

6 μ L de nucleótidos radioactivos (40 μ Ci por ensayo)

1 μ L de Klenow (DNA polimerasa I, 2.5 unidades)

3. El volumen final de 30 μ l se agita y se le da un pulso de centrifugación.

4. Se deja incubando la reacción a 37 °C por 7 h.

Se agregan 70 μ L de STE para llevar a un volumen final de 100 μ L.

5.7. Purificación de la sonda.

Este paso es necesario si se quiere conseguir una buena señal en la hibridación, ya que así se eliminan los nucleótidos que no se incorporaron a la sonda y solo se utilizan los fragmentos de DNA marcados (Sambrook *et al.*, 1989).

1. Colocar dentro de una jeringa desechable de 1 mL con aguja desprendible una capa de pelo de ángel estéril, muy compactada.
2. Llenar la jeringa con Sephadex G 50-80 (1 g/10mL de STE). La resina se equilibra con STE.
3. Colocar la jeringa en un tubo de 15 mL y centrifugar a 700 g (300 rpm) en una centrífuga clínica por tres minutos.
4. Empacar la columna hasta un volumen final de 0.9 mL.
5. Adicionar 0.1 mL de STE y realizar una nueva centrifugación.
6. Repetir el paso anterior tres veces más para asegurar que se filtra el volumen agregado en su totalidad.
7. Una vez preparada la columna se coloca la jeringa dentro de un tubo de 15 mL con un tubo de microcentrífuga en el fondo, dentro del cual descansa la jeringa. La columna debe soportarse sobre el borde del tubo mayor y llegar al tubo de microcentrífuga.
8. Agregar a la columna los 100 μ L de la reacción radiactiva.
9. Centrifugar por 3 min a 700 g (igual al tiempo y fuerza con la que se empacó la columna).

10. Agregar 100 μ L más de STE a la columna y realizar una nueva centrifugación.
11. Recuperar el tubo de microcentrifuga y medir el volumen recuperado que contiene el DNA radioactivo.

6. Extracción de RNA total de tejidos vegetales

Trabajar con RNA requiere de gran cuidado. El principal problema es la presencia en el ambiente de enzimas que degradan RNA. Para evitar contaminación y posibles degradaciones, el material debe ser esterilizado, lavado y tratado con H₂O DEPC, incluyendo las cámaras de electroforesis. De ser posible se usa simultáneamente un inhibidor comercial de RNAsas (*RNAse Zap* de Ambion) para limpiar superficies.

Se usó el método "Tri Pure Isolation Reagent" (Boeringher Inc.) para optimizar el rendimiento de extracción por mg de tejido. Este método se basa en los protocolos que contienen guanidina-fenol.

La extracción se realiza de la siguiente manera:

1. Tomar 100 mg de tejido y triturarlo congelando con Nitrógeno líquido en un mortero hasta obtener un polvo fino. Pasar a un tubo Eppendorf.
2. Agregar 1 mL de reactivo Tri Pure por cada 100 mg de tejido. Agitar en vortex por 30 s y dejar a temperatura ambiente por 1min.
3. Centrifugar a 12,000 *g* por 10 min a 4°C para eliminar el tejido que no se trituró bien y los residuos extracelulares y el exceso de polisacáridos y proteínas no solubles.
4. Agregar 0.2 mL de cloroformo por cada mL de Tri Pure. Agitar a mano por 15 s y dejar reposar a temperatura ambiente por 10 min.
5. Centrifugar a 12,000 *g* por 15 min a 4° C.
6. Colectar la fase acuosa o sobrenadante y pasarla a un nuevo tubo Eppendorf.
7. Agregar 0.5 mL de isopropanol. Agitar suavemente y dejar precipitando por 15 min a temperatura ambiente.
8. Centrifugar a 12,000 *g* por 15 min a 4° C y descartar el sobrenadante.
9. Lavar la pastilla con etanol al 75%.
10. Centrifugar a 7,500 *g* por 5 min a 4°C.

Resuspender la pastilla en agua tratada con DEPC y congelar a -70°C hasta su uso.

6.1. Cuantificación de RNA.

Para determinar la concentración y pureza del RNA en la muestra, se realiza un análisis espectrofotométrico. Se mide la absorbancia a 260 (ácidos nucleicos) y a 280 nm (proteínas). Así, para determinar la pureza del RNA, es decir, que tan libre de proteínas y residuos de fenol está, se obtiene un coeficiente de las lecturas en absorbancia a 260 nm y a 280 nm

$$260/280 = 1.8 - 2 \quad \text{Es una buena muestra.}$$

Para estimar la concentración de RNA en la muestra se utiliza la siguiente fórmula:

$$(260) \times (42.5 \mu\text{g}/\text{mL}) \times (\text{factor de dilución}) = \mu\text{g}/\text{mL}$$

Para corroborar que las muestras no se encuentran degradadas, es necesario revisar en un gel de agarosa (ver 5.2-2) pero en condiciones de esterilidad y libres de nucleasas. Por lo cual es necesario que todas las soluciones se preparen con H_2O tratada con DEPC (Apéndice 6) y estéril, al igual que todo el material.

7. Determinación de los niveles de mRNAs de las RNPs

7.1. Electroforesis de RNA en medio desnaturizante.

Una vez determinada la integridad del RNA se procede a correr las muestras en un gel desnaturizante de agarosa para posteriormente ser transferidas a un soporte sólido, una membrana de nylon.

1. Se prepara un gel al 1.2% de agarosa desnaturizante (30 mL), de la siguiente manera (Apéndice 6):

a) Agarosa	0.36 g
b) Agua bidestilada y desionizada DEPC	21.9 mL
c) MOPS 10 X	3 mL

2. Calentar para disolver la agarosa
3. Al entibiarse agregar 5.1 mL de formaldehído 37%
4. Las muestras de RNA son tratadas para garantizar una desnaturalización eficaz
4. de la siguiente manera:

a) Muestra	6	μL.
b) MOPS 10X	2.5	μL
c) Formaldehído 37 %	4	μL
d) Formamida	12.5	μL

5. Calentar a 60 °C por 5 min
6. Colocar en hielo y agregar 2 μL de amortiguador de carga.
7. Las muestras se colocan en los pozos del gel, el cual se corre a 45 V en la cámara de electroforesis empleando amortiguador MOPS 1X.

7.2. Transferencia de RNA a membrana de nylon.

Para llevar a cabo la detección de los mRNAs de interés es necesario transferirlo a una membrana de nylon (Hybond) que permita fijarlo y realizar hibridaciones tipo Northern. El tipo de membranas a utilizar es muy importante debido al tipo de cargas neta de las moléculas (Southern, 1975 ; Sambrook *et al.*, 1989). Para la transferencia es necesario montar un sistema que funcione por capilaridad, con lo cual el RNA contenido en el gel pasará a la membrana. El sistema consta de un recipiente (refractario pyrex) en el cual se coloca un placa de vidrio soportada en una caja Petri.

Sobre esa placa se coloca papel que servirá para pasar líquido a través de él y sobre éste, el gel y la membrana a la que se transferirá el RNA. El refractario contiene la solución de transferencia (SSC 20X), solución salina, que fluye al resto del sistema por papel filtro tipo Wattman y que arrastra por capilaridad las moléculas de RNA hacia la membrana.

1. Colocar dentro del refractario pyrex la tapa de una caja petri.
2. Colocar sobre la caja una placa de vidrio más grande que el área del gel.
3. Vertir la solución de transferencia SSC 20X (Apéndice 7).
4. Cortar tres tiras de papel 3 MM Whatman del mismo ancho del gel y lo suficientemente largas para que toquen la solución de transferencia. Humedecer las tres tiras con la solución de transferencia y colocarla sobre la placa de vidrio evitando que queden burbujas de aire.
5. Colocar perfectamente centrado el gel y boca abajo sobre los papeles.
6. Cortar una membrana Hybond- N⁺ del mismo tamaño del gel previamente humedecida en agua estéril por 20 min y colocarla centrada sobre el gel.
7. Colocar tres piezas de papel 3 MM del mismo tamaño del gel sobre la membrana.
8. Cortar papel periódico a la medida del gel y colocar una columna de aproximadamente 10 cm de alto.
9. Agregar un peso de 500 g sobre la columna de papel.
10. Realizar transferencia por un mínimo de 12 horas.
11. Al finalizar la transferencia el RNA se fija a la membrana aplicando radiación UV equivalente a 120,000 J/cm² por 2 min. La membrana se guarda envuelta en papel filtro y a 4 °C dentro de una bolsa de plástico para que conserve la humedad.

Es muy importante que todos los papeles y las tiras sean exactamente del mismo tamaño, así como de procurar no dejar burbujas de aire entre los papeles, la membrana y el gel para que la transferencia se realice de forma homogénea.

7.3. Northern blot (Northern, 1975 ; Sambrook *et al.*, 1989).

La hibridación tipo Northern blot permite detectar la presencia de mRNA de un gen específico. Se usa RNA desnaturalizado y fijo en una membrana de nylon. Cuando la sonda marcada está lista y el RNA fijo en la membrana, la hibridación se realiza de acuerdo con los siguientes pasos:

1. Prehibridar las membranas con la solución de hibridación por lo menos 20 min a 65 °C (Apéndice 7).
2. Desnaturalizar la sonda en baño María por 10 min a 65 ° C.
3. Traspasar inmediatamente a hielo y dejar reposar por lo menos 10 min antes de usarla.
4. Adicionar al sistema de hibridación la sonda con mucho cuidado.
5. Incubar toda la noche a 65 °C.
6. Lavar la membrana con amortiguador SSC y amortiguador de fosfatos (Apéndice 7) de la siguiente manera:
 - Dos lavados con SSC 2X, 0.1 % SDS a 65 °C por 5 min.
 - Dos lavados con SSC 1X, 0.1 % SDS a 65 °C por 10 min.
 - Un lavado con SSPE 0.1X, 0.1 % SDS a 65 °C por 20 min.
7. Es necesario monitorear los lavados con un contador Geiger para determinar cuando se haya perdido la hibridación inespecífica y solo quede la señal específica.
8. Exponer las membranas a las placas Biorad-Kodak del sistema "Personal Molecular Imager FX" de Bio-Rad para revelar y posteriormente digitalizar la imagen.
9. En algunos casos una misma membrana se empleó para realizar análisis con otras sondas. Antes de hibridar las membranas por segunda vez, se lavaron en condición de baja concentración de sales y a 65 ° C. Para asegurarse que no quedaran residuos de las sondas anteriores se les pasó el contador geiger y se expusieron nuevamente a las placas.

7.4. Estimación de la cantidad de mensajeros

Se realizaron densitometría de las cargas en los geles y de las bandas detectadas en los ensayos Northern blot usando el programa Quantity One del equipo Personal Molecular Imager FX de Bio-rad. Las lecturas de las cargas en los geles fueron transformadas a porcentajes relativos y las lecturas correspondientes a las señales se transformaron en unidades relativas proporcionales a la cantidad estimada de RNA en los geles.

VIII. RESULTADOS

1. Los anticuerpos contra la cp29 también reconocen a la cp31 y cp33.

Se probó la especificidad de los anticuerpos producidos en contra de la cp29, para lo cual se emplearon preparaciones de proteínas recombinantes cp29, cp31 y cp33 de *A. thaliana* (Barrios 2001) producidas en bacteria las cuales fueron separadas en un PAGE-SDS, transferidas a membranas de nylon y reveladas por Western blot con el anticuerpo anti cp29 (Rodríguez, no publicado). En la Figura 6A se muestra el gel que contiene las tres proteínas recombinantes, así como algunos controles de extractos de bacterias inducidas y sin inducir. En la Figura 6B se demuestra que los anticuerpos desarrollados en contra de la cp29 también reconocen a la cp31 y la cp33 recombinantes de *A. thaliana* y que este reconocimiento no es por la presencia de la etiqueta de histidinas en las proteínas recombinantes ya que el anticuerpo no detecta una proteína control que también presentaba esta etiqueta (carril 9).

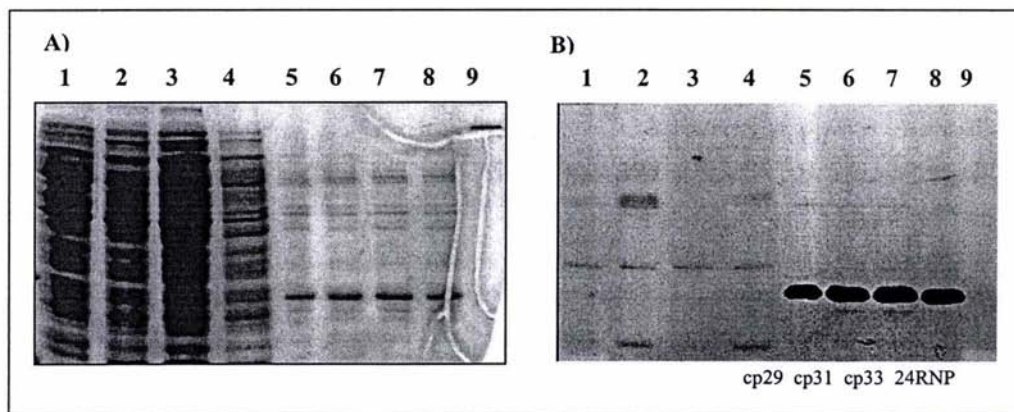


Figura 6. Inmunodetección empleando los anticuerpos anti-cp29. A) Gel teñido con coomassie y B) Western blot. Extractos de *E. coli* fueron utilizados como control: carril 1) M15 sin inducir, carril 2) M15 inducido, carril 3) pQE sin inducir, carril 4) pQE inducido, carril 5) cp29 recombinante, carril 6) cp31 recombinante, carril 7) cp33 recombinante, carril 8) 24RNP recombinante, carril 9) Piruvato fosfato dicinasa recombinante con etiqueta de histidinas. Todas las muestras corresponden a 30 μ g). La membrana se incubó toda la noche empleando una dilución del anti-cp29 de 1:15,000. El segundo anticuerpo (anti-IgY de gallina, acoplado con peroxidasa de rábano) se empleó a una dilución de 1:2,500

Las bandas correspondientes a las tres proteínas recombinantes muestran dos aspectos que requieren ser comentados. Uno es que presentan el mismo tamaño de las bandas, esto es debido a que las diferencias en el tamaño de las proteínas maduras no es muy grande y no son resueltas adecuadamente en este tipo de gel. Las proteínas maduras tienen un tamaño estimado de 26.3 kDa para la cp31, 27.8 kDa para la cp33 y 28.3 kDa para la cp29. Por otro lado las tres presentan un corrimiento correspondiente a un tamaño mayor que el pronosticado, es decir se ven a la altura de 33kDa. Esto es debido a que estas proteínas contienen en su estructura, un dominio ácido (DA) que provee una carga neta, lo que provoca que el patrón de corrimiento se altere incrementándose hasta en 7 kDa (Lisitsky *et al.*, 1994).

2. Determinación de los niveles de las cp29, cp31 y cp33 en tejidos con distintos tipos de plastidios.

Con el fin de determinar los niveles de las proteínas cp29, cp31 y cp33 en los diferentes plastidios se prepararon extractos de tejidos de plantas silvestres que presentaran etioplastos, cloroplastos, amiloplastos y cloroplastos senescentes, y de mutantes *cla1-1* para proplastidios (Figura 7). Los diferentes extractos fueron transferidos a membranas y analizados con los anticuerpos producidos en contra de la cp29 y que también reconocían a la cp31 y cp33 (Figura 6), o con los anticuerpos anti-24RNP de espinaca, como se describió en materiales y métodos.

En estos ensayos se observó la presencia de otras dos bandas bien definidas, de menor tamaño abajo de la cp29 (Figura 8). Dado el peso molecular de las proteínas maduras, la semejanza estructural que presentan y debido a que son reconocidas por el anticuerpo contra la cp29, proponemos que estas bandas corresponden a la cp31 y cp33. Sin embargo, es importante señalar que estas bandas corren a distintas posiciones en el gel y no a una misma distancia, como se había observado con las proteínas recombinantes (Figura 6). Una posible explicación a esto es que las proteínas silvestres, presentes en los extractos vegetales, tengan modificaciones post-traduccionales que alteren de manera diferencial sus patrones de corrimiento en los geles. Sin embargo, para efecto de este trabajo, en el análisis de estos resultados se considerarán las proteínas como lo señalado en la figura 8, lo cual está basado en las

secuencias de aminoácidos para las proteínas maduras propuestas por Ohta *et al.*, 1995.

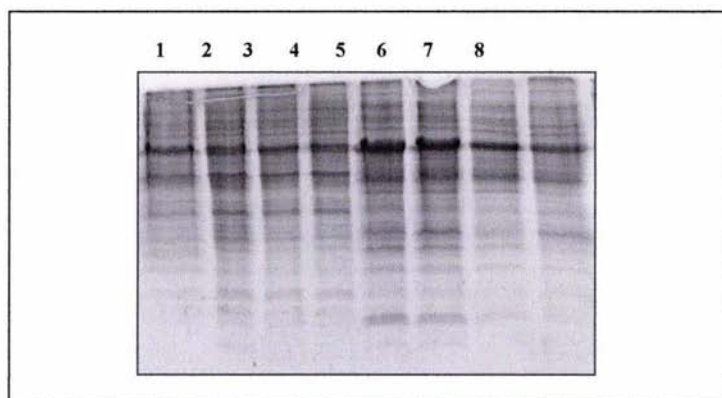


Figura 7. Extractos proteicos de tejidos de *Arabidopsis thaliana* con diferentes tipos de plastidios. Proteína (30 μ g por carril) de diferentes tejidos, fue separada en un PAGE-SDS y teñida con azul de Coomassie. Carriles 1-4, extracto de tejido con cloroplastos; carriles 5 y 6, extracto con tejido con proplastidios; carril 7, extracto de raíz (amiloplastos) y carril 8, extracto de tejido etiolado (etioplastos).

Las cp29, cp31 y cp33 fueron detectadas tanto en tejidos con cloroplastos como con proplastidios. En la primer semana de edad de las plántulas silvestres, así como en las dos primeras semanas de los proplastidios se observan las tres proteínas en cantidades más o menos semejantes. A la segunda semana de desarrollo de los cloroplastos la cp31 y la cp33 disminuyen y ya para la tercera semana también la cp29 disminuye considerablemente. Para mantenerse en muy bajos niveles para la cuarta semana (Figura 8). Dado que el análisis en los proplastidios es en una mutante, consideramos que solamente las primeras observaciones tendrían un significado biológico real, puesto que el estadio de proplastidio no existe durante cuatro semanas en una plántula normal. Aunque la cp29 es la única proteína presente en extractos con proplastidios de tres semanas de edad, no sabemos que significado tiene ya que para la cuarta semana nuevamente se observan las tres proteínas (Figura 8).

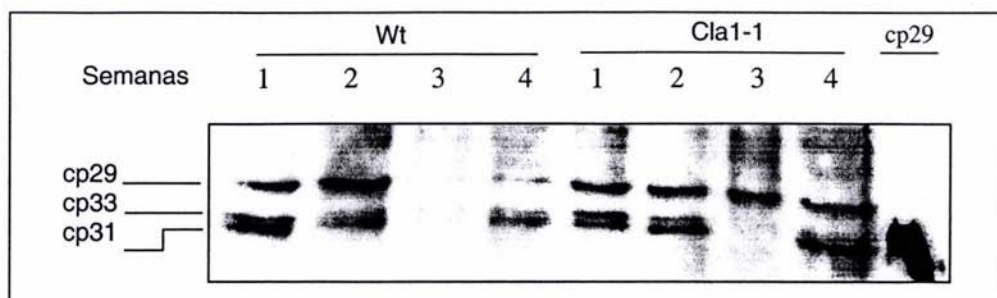


Figura 8. Detección de las cps en cloroplastos y proplastidos de diferentes edades empleando el anticuerpo anti-cp29. Muestras (30 μ g) de tejidos con cloroplastos y proplastidios de una a cuatro semanas fueron resueltas en un PAGE-SDS, transferidas a una membrana de nylon y reveladas empleando el anticuerpo anti-cp29 como descrito en la figura 7. La muestra control es un extracto bacteriano que sobreexpresa la cp29.

Se determinaron los niveles de las cp29, cp31 y cp33 en etioplastos, amiloplastos y cloroplastos senescentes empleando la técnica de Western blot con el anticuerpo anti-cp29 (Figura 9). En etioplastos y cloroplastos senescentes solamente se observó la cp31 en muy baja cantidad, no detectándose ni la cp33 ni la cp29. Mientras que en amiloplastos ninguna proteína pudo ser detectada.

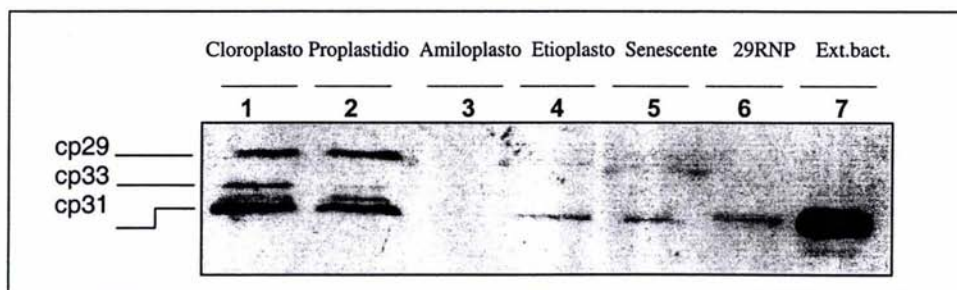


Figura 9. Detección de las diferentes cps en tejidos con distintos tipos de plastidios, empleando el anti-cp29. Muestras (30 μ g) de tejidos con cloroplastos, proplastidios y etioplastos de dos semanas de edad, amiloplastos (raíz) y cloroplastos senescentes de cuatro semanas de edad. Las muestras control son la cp29 purificada (2 μ g) y un extracto bacteriano que sobreexpresa la cp29.

Dado que la cp29 de *Arabidopsis* es muy semejante a la 24RNP de espinaca, y puesto que en el laboratorio previamente se habían producido anticuerpos en contra de esa proteína (Robles, 2000), se decidió realizar el análisis descrito anteriormente, empleando los anticuerpos anti-24RNP. Con este anticuerpo, en cloroplastos y proplastidios, solo se pudieron ver dos bandas de proteína en vez de las tres observadas con el anti-cp29, estas dos bandas corresponderían a las proteínas cp31 y cp33 (Figura 10). Los niveles de expresión de estas dos proteínas en cloroplastos fueron semejantes a los observados empleando el anti-cp29, es decir, hubo una gran disminución en cloroplastos de tres semanas de edad. En proplastidios se observan niveles semejantes de cp33 y cp31. En amiloplastos el anticuerpo detectó una proteína por arriba de la cp31 y cp33, la cual parece corresponder a la cp29. Mientras que en etioplastos se observan dos bandas que parecen ser la cp29 y la cp33, en cloroplastos senescentes se observa solamente una banda que podría ser la cp31.

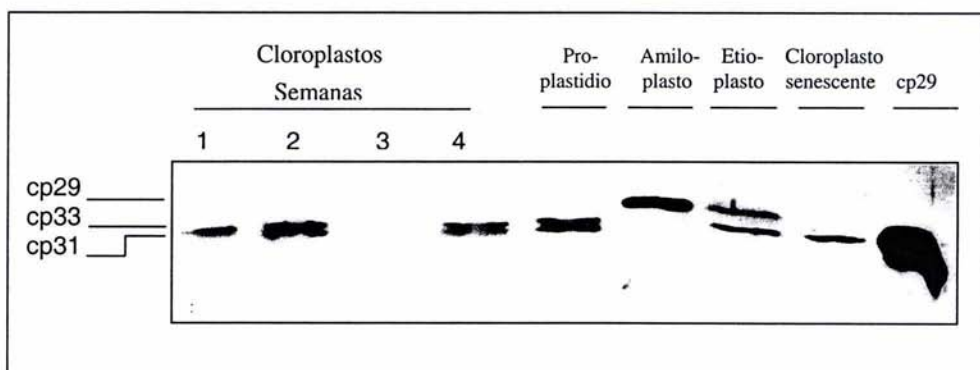


Figura 10. Detección de las diferentes cps en tejidos con distintos tipos de plastidios, empleando el anti-24RNP. Muestras (30 μ g) de tejidos con cloroplastos de una a cuatro semanas de edad, proplastidios y etioplastos de dos semanas de edad, amiloplastos (raíz) y cloroplastos senescentes fueron revelados con anticuerpos anti-24RNP. La muestra control es un extracto bacteriano que sobre-expresa la cp29.

3. Determinación de los niveles de mRNAs de las cp29, cp31 y cp33 en tejidos con distintos tipos de plastidios.

La detección de la presencia de los mensajeros que codifican las proteínas cp29, cp31 y cp33 se realizó en extractos de RNA total de tejidos con cloroplastos y proplastidios empleando ensayos tipo Northern blot. El laboratorio ya contaba con los cDNAs que fueron utilizados como sondas para estos ensayos: los genes *athcp29*, *athcp31* y *athcp33* correspondientes a las proteínas cp29, cp31 y cp33 de *Arabidopsis thaliana* respectivamente.

Las hibridaciones fueron hechas con estas sondas en membranas que contenían RNA total de las muestras de cada tipo de plastidio (Figura 11). Las membranas se expusieron en una placa del sistema "Personal Molecular Imager FX" de Bio-Rad con los siguientes tiempos: dos días de exposición para la cp29 y la cp31 y 7 días de exposición para la cp33.

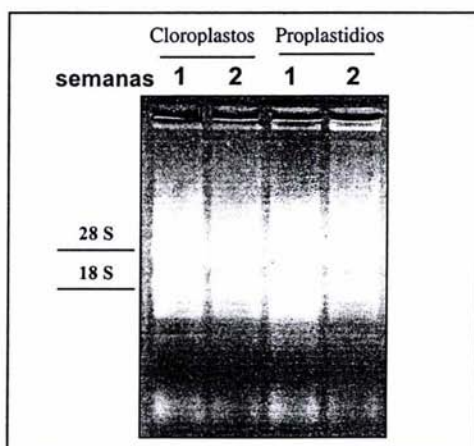


Figura 11. Gel desnaturalizante con RNA total de tejido con cloroplastos y proplastidios de una y dos semanas de edad. Todas los carriles fueron cargados con 30 µg de RNA. A la izquierda se muestra la posición de los RNAs ribosomales presentes en los extractos.

En la Figura 12 se observa la presencia de mRNA del gen *athcp29* en tejidos con cloroplastos y proplastidios. En la sección A) se presentan los geles de RNA que fueron cargados con cantidades de RNA similares medidas a 260 nm. A pesar de que las mediciones en el espectro fueron semejantes, las cantidades de RNA observadas

en el gel no son las mismas, por lo tanto los niveles de los mensajeros de *athcp29* (Figura 12D) se normalizaron con base en los valores de la carga de RNA en los geles (Figura 12C). Los niveles de mensajero va aumentando de una a cuatro semanas en tejido con cloroplastos, mientras que en proplastidios los niveles del mensaje disminuyen de una a cuatro semanas de edad (Figura 12B y 12D). La acumulación de mRNA es mayor en tejidos con proplastidios de una semana de edad y en tejido con cloroplastos de cuatro semanas de edad. No se detecta mRNA en tejidos con cloroplastos de una semana de edad ni en tejidos con proplastidios de cuatro semanas de edad.

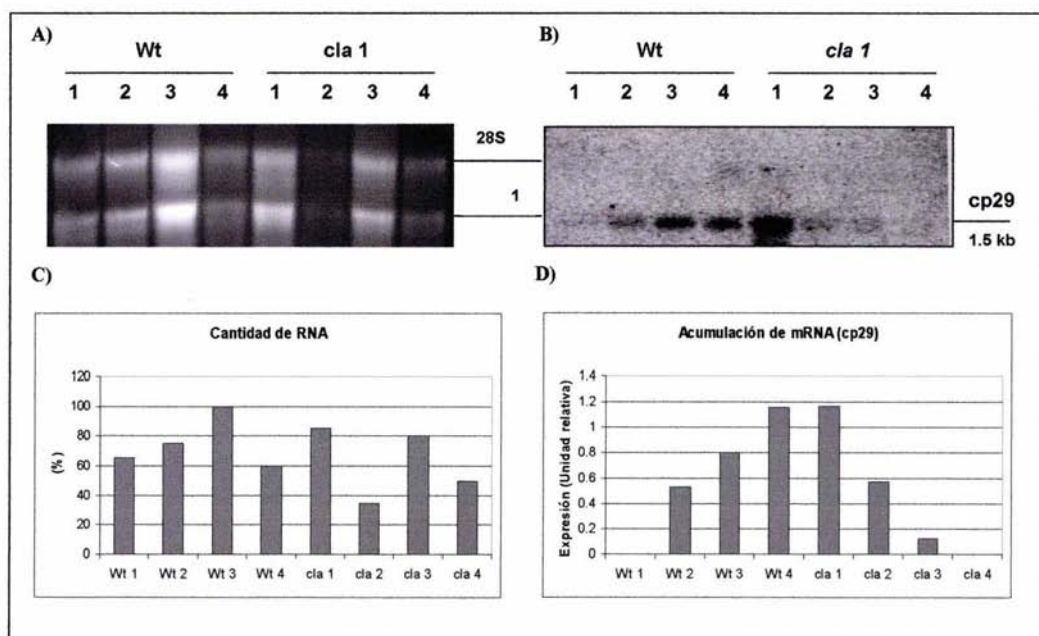


Figura 12. Niveles de mensajeros del gen *athcp29* en tejidos con edades de una a cuatro semanas, que contienen cloroplastos y proplastidios. A) RNA total de tejidos de *A. thaliana* con cloroplastos y proplastidios (30 µg) resuelto en un gel de agarosa desnaturalizante y teñido con bromuro de etidio. Los números en la parte superior de los carriles corresponden a las semanas de edad del tejido. B) El RNA fue transferido a una membrana, hibridado con la sonda del gen *athcp29* marcada radiactivamente y expuesto para obtener las señales. C) Estimación del contenido real de RNA por carril, llevado a cabo por densitometría. D) Densitometría de las señales de hibridación representadas normalizadas con base en el RNA presente en cada carril. 18S y 28S señalan las posiciones de los RNA ribosomales.

La hibridación con la sonda *athcp31* en RNA total de tejidos con cloroplastos y proplastidios de una a cuatro semanas de edad se presenta en la Figura 13. En la sección A) se presenta el RNA total de cada uno de los tejidos estudiados. En B) se presentan las señales de hibridación. Se observa el mensajero del gen *athcp31* tanto en tejidos que contienen cloroplastos proplastidios como en los que contienen proplastidios (Figura 13B). En tejido con cloroplastos se observa la mayor cantidad de este mensajero a las dos semanas de edad y posteriormente presenta una disminución hasta las cuatro semanas (Figura 13D). En proplastidios, no se detecta mRNA en tejido de una semana de edad y empieza a incrementar a las dos semanas, pero a niveles que no llegan a los observados en cloroplastos (Figura 13D).

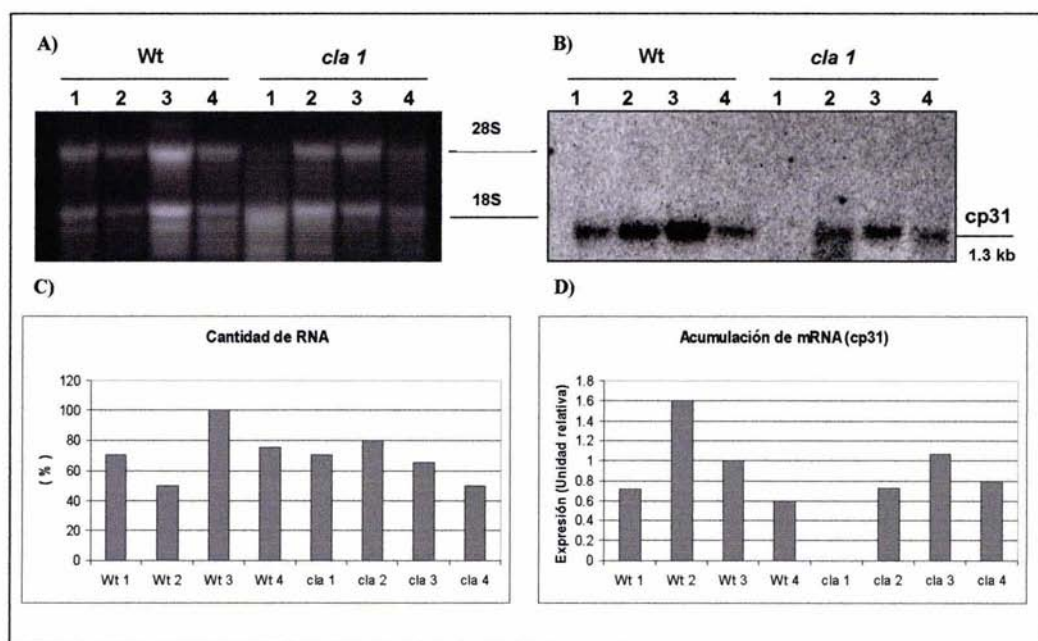


Figura 13. Niveles de mensajeros del gen *athcp31* en tejidos con edades de una a cuatro semanas, que contienen cloroplastos y proplastidios. Descripción igual que en Figura 12.

En la Figura 14 se observa la acumulación de mRNA correspondiente al gen *athcp33*, en tejidos que contienen cloroplastos y proplastidios. Como puede observarse, los niveles de este mensajero en cloroplastos son muy bajos mostrando su mayor nivel a las dos semanas de edad. En proplastidios no se observa ninguna señal. Estos bajos niveles de acumulación en tejido con cloroplastos coinciden con los reportados por Ohta y colaboradores (1995).

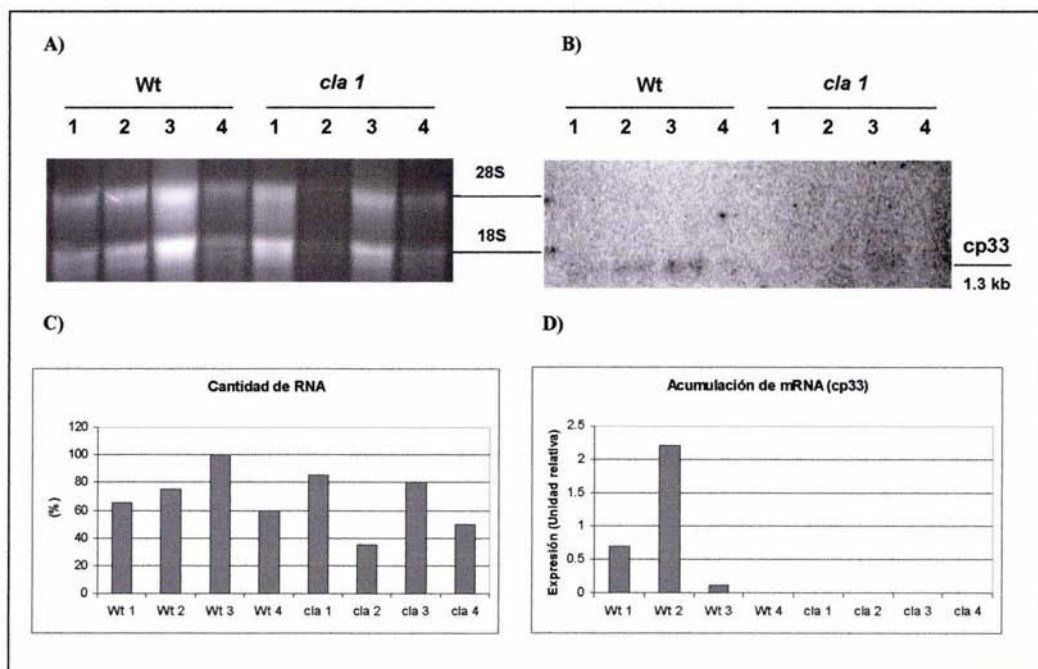


Figura 14. Niveles de mensajeros del gen *athcp33* en tejidos con edades de una a cuatro semanas, que contienen cloroplastos y proplastidios. Descripción igual que en Figura 12.

4. Análisis global.

En la Tabla 5 se resumen los cambios observados tanto en la acumulación de las proteínas cp29, cp31 y cp33 así como de sus mRNAs en tejidos que contienen cloroplastos y proplastidios de una a cuatro semanas de edad.

Tabla 5. Acumulación de proteínas cp29, cp31 y cp33 y sus mRNAs en *Arabidopsis thaliana* en tejidos de una a cuatro semanas de edad con cloroplastos y proplastidios.

Semanas	Cloroplastos				Proplastidios				Amiloplastos	Etioplastos	Clorop. Senes.
	1	2	3	4	1	2	3	4			
cp 29	+++	++++	±	++	+++	+++	+++	+++		-	-
cp 31	+++	++	±	++	++	++		++		±	±
cp 33	++	++	±	++	++	+		+			
mRNA (cp 29)		++	+++	++++	++++	++	+		ND	ND	ND
mRNA (cp 31)	++	++++	+++	++		++	+++	++	ND	ND	ND
mRNA (cp 33)	+	++++	±					-	ND	ND	ND

(++++) Muy abundante, (+++) Abundante, (++) Poco abundante, (+) Muy poco abundante, (±) Baja, (-) Apenas detectada, (ND) No determinada, () No detectada.

Las proteínas cp29, cp31 y cp33, se expresan fuertemente en tejidos con cloroplastos de una y dos semanas de edad y disminuyen en tejidos de tres y cuatro semanas de edad, manteniendo más o menos la misma proporción entre ellas. En tejido con proplastidios de una a dos semanas de edad, las tres proteínas se encuentran abundantemente y en proporciones similares, la cual cambia drásticamente en tejido con tres y cuatro semanas de edad. Sin embargo, los resultados obtenidos usando tejido con proplastidios a tiempos muy largos, no corresponden a una realidad biológica, ya que probablemente no existan tejidos con proplastidios de esa edad pues estos se transforman en diferentes tipos de plastidios. En etioplastos y cloroplastos senescentes, solo se detectó la cp31, mientras que en amiloplastos no se detectó ninguna de estas proteínas.

En lo que respecta a los niveles de mensajeros, una consideración importante en este análisis es que la estimación de sus niveles solamente es comparable para el mismo gen y no es posible realizar comparaciones entre ellos. La cp29 presenta un

incremento en la acumulación de este mensaje hasta las cuatro semanas, mientras que en proplastidios, la mayor acumulación de mRNA es en tejido que contiene proplastidios de una semana para luego disminuir. Para la cp31 se puede considerar que los niveles de mensajero se mantienen más o menos constantes durante el período estudiado presentado la mayor acumulación en tejidos con cloroplastos de dos semanas de edad. En el caso de la cp33 los niveles de expresión parecen ser muy bajos y no se detectó expresión en proplastidios.

IX. DISCUSIÓN

Consideraciones previas.

En el laboratorio se generaron anticuerpos contra la cp29 de *Arabidopsis thaliana* y su homóloga 24RNP de espinaca. Dichos anticuerpos fueron creados en gallinas y conejas, respectivamente (Robles, 2000; Vianney Rodríguez, comunicación personal). Estos anticuerpos fueron empleados para realizar los Western blots en el presente trabajo.

La secuenciación del genoma de *Arabidopsis thaliana* indica que existen más de 200 proteínas putativas del tipo de las de unión a RNA (Fedoroff, 2002). En el caso de las cp's de tabaco existen isoformas como la cp29A y cp29B (Hirose y Sugiyura, 2001) y son muy abundantes en el estroma: hasta 10^7 moléculas por cloroplasto (Nakamura *et al.*, 2001).

Los resultados de los Western blots hechos con Ab 24RNP, indican que este anticuerpo reconoce a su proteína homóloga en *Arabidopsis thaliana*, la cp29 en los extractos de los diferentes tejidos y en el extracto bacteriano que sobre-expresa la proteína. Esto constituye una buena referencia para confirmar la presencia de la proteína cp29 y sugerir la de cp31 y cp33 en los tejidos con diferentes tipos de plastidios.

Los resultados obtenidos de los Northern blots detectaron acumulación de los mensajes correspondientes a las cp29, cp31 en tejidos con proplastidios y cloroplastos y solo en cloroplastos para la cp33. Cabe resaltar que los resultados obtenidos usando tejido con proplastidios no corresponden fielmente a una realidad biológica, ya que son

tomados de una mutante usada como modelo experimental que no se encuentra en la naturaleza.

Expresión en tejido con proplastidios.

Puede suponerse que la presencia de mRNA y proteínas cp29, cp31 y cp33 en tejidos con proplastidios, se deba a dos cosas: a que los proplastidios, precursores del resto de los plastidios, mantienen niveles basales de transcripción y traducción; y a que en el proceso de biogénesis del cloroplasto inducido por la luz, aumenta hasta 1000 veces la presencia de mensajes.

Considerando que el tejido fue tomado de plantas mutantes *cla-1* cultivadas en un fotoperíodo igual a las plantas silvestres, que *cla-1* no muestra alteración en la transducción de señales de luz, ni en la expresión de genes cloroplásticos y que se detecta mRNA de los genes *athcp29* y *athcp31* y sus proteínas, podemos suponer que estos proplastidios expresan los genes *athcp29*, *athcp31* y *athcp33* normalmente por influencia de luz, además de que algunas RNPs se expresan influenciadas también por este factor. Podemos sugerir que las cp31 y cp33 están presente en este tejido y que, probablemente junto con la cp29, están formando complejos y estabilizando mensajeros, según lo propuesto por Hirose y Sugiura (2001). De los resultados obtenidos usando tejido con proplastidios solo corresponden a una realidad biológica los que tienen una o dos semanas de edad, ya que probablemente no existan tejidos con proplastidios de mayor edad, pues estos se transforman en diferentes tipos de plastidios conforme avanza el desarrollo de la planta.

Expresión en tejido con cloroplastos.

Los cloroplastos son los que tienen la capacidad fotosintética, es decir, una intensa actividad bioquímica. Por ello deben mantener niveles constantes de mRNAs estables para el recambio de proteínas que intervienen en el proceso fotosintético.

En este estadio, la presencia de las proteínas de unión a RNA resulta esencial para formar los complejos que permiten mantener mensajeros estables (Hirose y Sugiura, 2001). De esta manera se puede interpretar la presencia y abundante acumulación de mensajes correspondientes a los genes *athcp29*, *athcp31* y *athcp33* y de proteínas cp29, cp31 y cp33, es decir, están presentes para llevar a cabo procesos post-

transcripcionales que permitan la producción y recambio de las proteínas que requiere el organelo para su función. La abundante presencia de las tres proteínas en tejidos con una y dos semanas de edad, probablemente se deba al aumento del tejido fotosintético y su actividad bioquímica.

Expresión en tejido con amiloplastos.

En el caso de los amiloplastos, plastidios que se encuentran en la raíz, en donde la luz es un factor que no interviene y que por ello distan mucho de tener una capacidad fotosintética, no se detecta presencia de proteína cp29, cp31 y cp33 y los niveles de mRNA de los genes *athcp29*, *athcp31*, *athcp33* reportados son muy bajos (Ohta *et al.*, 1995). La raíz es un órgano muy especializado, por lo tanto, los amiloplastos se especializan también en el almacenamiento de almidones y en el geotropismo. La sutil presencia de mensajes (Ohta *et al.*, 1995), puede deberse a los niveles basales de transcripción y a la potencial diferenciación de los meristemos y sus plastidios. Se puede pensar que la baja concentración de mensajeros se debe a un plan de desarrollo morfogénico.

Expresión en tejido con etioplastos.

Los etioplastos se encuentran en plantas cultivadas en la oscuridad, son considerados estados transitorios en la biogénesis del cloroplasto y contienen casi todos los elementos fotosintéticos. En tejido rico en etioplastos se detecta únicamente proteína cp31, lo que sugiere que la luz no es el único factor para la expresión de estas proteínas y que su expresión puede depender de su posible intervención en un plan de morfogénesis (Fedoroff, 2002). La presencia de la proteína se puede explicar por que los etioplastos son un estadio previo a la capacidad fotosintética, en los que existe una mayor abundancia de proteínas y la transcripción es activa a nivel basal, por lo que encontramos a estas proteínas en su mínima expresión.

Expresión en tejido con cloroplastos senescentes.

Al disminuir la cantidad de luz, la actividad fotosintética se atenúa. Según los datos mostrados por Baginsky y Gruijsem (2002), en estas condiciones existe un proceso

de regulación post-transcripcional que lleva a la degradación de mensajeros. Por lo tanto, la presencia de proteínas del sistema fotosintético disminuye su expresión y no pueden ser recambiadas. Considerando lo anterior se puede decir que la presencia de proteínas cp29, cp31 y cp33 se ve drásticamente disminuida por que sus mensajes, en ausencia de luz, son degradados y no hay recambio de ellas. Por otro lado, si consideramos el modelo propuesto por Thomson y Whatley para la diferenciación de plastidios, los cloroplastos de las plantas cultivadas en luz y transferidas a oscuridad pueden adquirir un estado muy parecido a los etioplastos, por lo que la señal en los ensayos de Western blot es muy similar entre extractos de plantas con cloroplastos senescentes y plantas etioladas.

X. CONCLUSIONES

- Queda claro que la luz no es el único factor en la activación de genes cloroplásticos; esto sugiere que la presencia de proteínas reguladoras a nivel postranscripcional responde también a un desarrollo morfogénico de la planta. Así lo sugieren los resultados de tejido con amiloplastos y etioplastos.
- Existe expresión diferencial de la cp29, cp31 y cp33 en tejidos con distintos tipos de plastidios:
 - a) En amiloplastos no se detecta ninguna de las tres proteínas.
 - b) En etioplastos y cloroplastos senescentes se detecta muy poca cantidad de cp31.
 - c) En cloroplastos y proplastidios se detectan mensajeros de los genes *athcp29*, *athcp31*. El *athcp33* se encuentra en muy escaso nivel.
 - d) La mayor acumulación de mRNA correspondiente a la cp31 se da en tejido con cloroplastos de dos semanas de edad y en tejido con proplastidios de tres semanas de edad.
 - e) La mayor acumulación de mRNA correspondiente a la cp33 se da en tejido con cloroplastos de dos semanas de edad
 - f) La cantidad de proteína cp29, cp31 y cp33, disminuyen su acumulación en tejidos con cloroplastos de tres semanas de edad.
- De los resultados obtenidos en proplastidios de la mutante CLA1-1, consideramos que solamente las primeras semanas tendrían un significado biológico real, puesto que el estadio de proplastidio no existe durante cuatro semanas en una plántula normal.
- La presencia de las proteínas cp29, cp31 y cp33 se encuentra relacionada con adquisición de una intensa actividad bioquímica.

XI. APÉNDICES

1. Medio Murashige y Skoog (MS).

Solución nutritivas en stocks de 100X (500 mL)

I Nitratos (Potasio y amonio)	2.5 mL
II Sulfatos (Magnesio, Manganeso, Zinc y Cobre)	2.5 mL
III Halógenos (Cloruro de Ca, Yoduro de K y Cloruro de Co)	2.5 mL
IV Fosfato de potasio, Ac. Bórico, Molibdato de sodio	2.5 mL
V Quelantes (Sulfato ferroso, Na ₂ EDTA)	2.5 mL
Vitamina B ₅	5 mL
Sacarosa 2%	10 g
Agar	4 g
Aforar a 500 mL	

Esterilizar en autoclave, al enfriar agregar 150 µL de Kanamicina

Antibióticos

Ampicilina o Kanamicina 100 mg

Disolver la ampicilina o la kanamicina en 500 µL de agua destilada y desionizada, aforar a 1 mL y esterilizar por filtración. Guardar a -20 °C en alícuotas de 50 µL.

2. Extracción de proteínas de tejidos vegetales

Soluciones stock de inhibidores de proteasas

Pefablock	100 mg/mL
Pepstatina	1 mg/mL
Leupeptina	1 mg/mL
Bestatina	5 mg/mL

Buffer de extracción 1X

Tris base [pH 7.5]	100 mM
EDTA	5.0 mM
Sacarosa	0.3 mM
EGTA	5.0 mM
MgCl ₂	5.0 mM
β-mercaptoetanol	40 mM
Pefablock	0.5 mg/mL
Pepstatina	1.0 µg/mL
Leupeptina	0.5 µg/mL
Bestatina	40 µg/mL

Preparar la solución 2X con todos los componentes hasta el $MgCl_2$. Esterilizar a 15 lb durante 15 min y guardar en refrigeración.

Antes de iniciar la extracción diluir el buffer a una concentración 1X y añadir los inhibidores de proteasas tomados a partir de una solución stock y finalmente agregar β mercaptoetanol.

Para 1 mL de buffer de extracción añadir:

Pefablock	5.0 μ L
Pepstatina	1.0 μ L
Leupeptina	0.5 μ L
Bestatina	8.0 μ L
β -mercaptoetanol	2.8 μ L

3. Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (PAGE-SDS)

Acilamida 30% (100 mL)

Acilamida	30 g
Bisacilamida	0.8 g

Buffer separador 25X (100 mL)

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

Buffer apilador 25X (100 mL)

Tris base 1.5 M [pH Y]	18.17 g
SDS al 20%	2.0 mL

Buffer de carga 5X (10 mL)

Tris 1 M [pH 6.8]	3.125 mL
Glicerol	5.0 mL
SDS (1% final)	0.5 g
Azul de bromofenol 10%	0.2 mL
β -mercaptoetanol	4 μ L por 20 μ L de buffer (añadir al momento de usar el buffer)

Buffer de corrida 10X (1 L)

Tris base	30 g
Glicina	144 g
SDS	10 g

Utilizar el buffer a una concentración 1X

Persulfato de amonio al 20%

Colorante Coomassie para teñir geles (100 mL)

Coomassie brilliant blue R250	0.25 g
Metanol grado técnico	45.4 mL
Agua	45.4 mL
Ácido acético glacial	9.2 mL

Solución fijadora y desteñidora (100 mL)

Metanol 20%	20 mL
Ácido acético 7.5%	7.5 mL

4. Western blot.

Buffer de transferencia (1L)

Tris 25 mM [pH 8.3]	3.03 g
Glicina 192 mM	14.4 g
Metanol 20% v/v	200 mL

El metanol se agrega inmediatamente antes de realizar la transferencia.

Tris-buffer salino (TBS)

NaCl	50 mM
Tris [pH 7.4]	50 mM

TBS-T (0.1%)

TBS + 0.1% tween 20

5. Preparación de geles de agarosa al 1.5% para DNA

Agarosa	0.38 g
Agua bidestilada y desionizada	25 mL

Calentar hasta disolver la agarosa.
Agregar al entibiarse 0.5 mL de TAE 50X.

Buffer TAE 50X

Tris base	242 g
Ácido acético glacial	57.1 mL
EDTA 0.5 M [pH 8]	100 mL

El amortiguador de carga se prepara :

Azul de bromofenol	0.25%
Xilen cianol	0.25%
Glicerol en agua estéril al	40%

6. Preparación de geles de agarosa al 1.2% para RNA (30 mL).

Agarosa	0.36 g
Agua bidestilada y desionizada DEPC	21.9 mL
MOPS 10X	3 mL
Calentar para disolver la agarosa	
Agregar al entibiarse de Formaldehído 37%.	5.1 mL

Las muestras se preparan de la siguiente manera:

Muestra	6 μ L
MOPS 10X	2.5 μ L
Formaldehído 37%	4 μ L
Formamida	12.5 μ L

Calentar a 60 °C por 5 min
Colocar en hielo y agregar 2 μ L de Colorante

Preparación de buffer MOPS 20 X

MOPS	0.4 M
Acetato de sodio [pH 7]	0.1 M
EDTA	0.02 M

7. Northern blot.

Preparación de la solución de transferencia SSC 20X

Na Cl	3 M
Citrato de Na	0.3 M

Se disuelven en 800ml de H₂O Destilada y desionizada.
Se ajusta el pH 7 -8 y se lleva a un volumen final de 1 litro.

La solución de hibridación

Albúmina bovina frac. V	1%
SDS	20%
EDTA	0.5 M
Buffer de fosfatos	1 M

XII. BIBLIOGRAFÍA

- Audersik T, Audersik G (1996)** *Biología*. Cuarta edición. Prentice Hall. México. 947pp.
- Baaginsky S, Gruissem W (2002)** Endonucleolytic activation directs dark-induced chloroplast mRNA degradation. *Nucl. Acid Res.* 20: 4527-4533.
- Barrios RA (2001)** Subclonación en un vector de expresión de los genes que codifican a tres proteínas de unión a mRNA (RNPs) de *Arabidopsis thaliana*. Tesis de licenciatura en Química de Alimentos Fac. Química. U.N.A.M.
- Cook WB, Walker JC (1992)** Identification of a maize nucleic acid-binding protein (NBP) belonging to a family of nuclear-encoded chloroplast proteins. *Nucl. Acid Res.* 29:359-364.
- Deng XW, Stern DB, Tonkyn JC, Gruissem W (1987)** Plastid run-on transcription: application to determine the transcriptional regulation of spinach plastid genes. *J. Biol. Chem.* 262:9641-9648.
- Deng XW, Gruissem W (1987)** Control of plastid gene expression during development in non-photosynthetic plastids of higher plants. *EMBO J.* 7:3301-3308.
- Deng XW, Gruissem W (1988)** Constitutive transcription and regulation of gene expression during development: the limited role of transcriptional regulation. *Cell* 49:379-387.
- Estevez JM, Cantero A, Romero C, Kawaide H, Jiménez LF, Kuzuyama T, Seto H, Kamiya Y, León P (2000)** Analysis of the expression of CLA1, a gene that encodes the 1-deoxylulose 5-phosphate synthase of the 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 124: 95-103.
- Fedoroff NV (2002)** RNA-binding proteins in plants: the tip of an iceberg? *Curr. Opin. Plant Biol.* 5:452-459.
- Fukami KK, Tomoda S, Go M (1993)** Evolutionary clustering and functional similarity of RNA-binding proteins. *FEBS Lett.* 335:289-293.
- Goldschmidt-Clermont M (1998)** Coordination of nuclear and chloroplast gene expression in plants cells. *Int. Rev. Citol.* 177:117 163.
- Gruissem W, Barkan A, Deng XW, Stern D (1988)** Transcriptional and post-transcriptional control of plastid mRNA levels in higher plants. *TIG* 4:258-263.

- Hsu-Ching C, Stern D (1991)** Specific ribonuclease activities in spinach chloroplasts promote mRNA maturation and degradation. *J. Biol. Chem.* 266:1-7.
- 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.
- Hirose T, Sugiura M (2001)** Involvement of a site-specific trans-acting factor and a common RNA-binding protein in the editing of chloroplast mRNAs: development of a chloroplast *in vitro* RNA editing system. *EMBO J.* 20 (5): 1144-1152.
- Kirk JTO, Tilney-Basset R (1978)** The Plastids. Second edition. Elsevier/North Holland Bomedical Press. 960pp
- 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.
- Li Y, Sugiura M (1990)** Three distinct ribonucleoproteins from tobacco chloroplast: each contains a unique amino terminal acidic domain and two ribonucleoprotein consensus motifs. *EMBO J.* 9:3059-3066.
- Lisitsky I, Liveanu V (1994)** RNA-binding activities of the different domains of a spinach chloroplast ribonucleoprotein. *Nucl. Acids Res.* 22:4719-4724.
- Lisitsky I, Liveanu V, Schuster G (1995)** RNA-binding characteristics of a ribonucleoprotein from spinach chloroplast. *Plant Physiol.* 107:933-941.
- Ludevid MD, Freire MA, Gómez J, Burd CG, Albericio F, Giralt E, Dreyfuss G, Pagés M (1992)** RNA binding characteristics of a 16 kDa glycine- rich protein from maize. *Plant J.* 2:999-1023.
- Mandel A, Felldman K, Herrera-Estrella L, Rocha-Sosa M, León P (1996)** CLA1, a novel gene required for chloroplast development, is highly conserved in evolution. *Plant J.* 9:649-658.
- Meyeroewitz E (1995)** *Arabidopsis* as a model organism. Homeotic genes and development in a plant. New York, Ogito Learning Media, Inc.
- Mohr H, Schopfer P (1995)** Plant Physiology. Ed Springer-Verlang, Germany. pp 141, 375-382.
- Mullet JE (1993)** Dynamic regulation of chloroplast transcription. *Plant Phys.* 103:309-313.

- Mullet JE (1988)** Chloroplast development and gene expression. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39:475-502.
- Ni Z, Sun Q, Liu Z, Wu L, Wang X (2000)** Identification of a hybrid-specific expressed gene encoding a novel RNA-binding protein in wheat seedlings using differential display of mRNA. *Mol. Gen Genet.* 263:934-938.
- Nakamura T (1999)** Chloroplast ribonucleoproteins function as a stabilizing factor of ribosome-free mRNA in the stroma. *J. Biol. Chem.* 276:147-152.
- Ohta M, Sugita M, Sugiura M (1995)** Three types of nuclear genes encoding chloroplast RNA-binding proteins (cp29, cp31 and cp33) are present in *Arabidopsis thaliana*: presence of cp31 in chloroplast and its homologue in nuclei/cytoplasm. *Plant Mol. Biol.* 27:529-539.
- Pyke K.A (1999)** Plastid division and development. *Plant Cell.* 11:549-556.
- Reinhard R, Gabriele K (1999)** mRNA degradation in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 23:353-370
- Robles S.G (2000)** Expresión en bacteria de la proteína de 24KDA de espinaca que se une a RNA de cloroplasto (24RNP), producción de anticuerpos y su caracterización. Tesis de licenciatura en Química Farmaceutica – Biológica. Fac. Química. U.N.A.M.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989)** Molecular Cloning. A laboratory manual. Second Edition. New York Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schuster G, Gruissem W (1991)** Chloroplast mRNA 3' end processing requires a nuclear-encoded RNA-binding protein. *EMBO J.* 10:1493-1502.
- Schuster G, Lisitsky I, Klaff P (1999)** Polyadenylation and degradation of mRNAs in the chloroplast. *Plant Physiol.* 120:937-944.
- Shamoo Y, Manan A, Patten AM, Crawford JK, Pellegrini MC, Williams KR (1994)** Both RNA-binding domains in heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 contribute toward single-stranded-RNA binding. *Biochemistry* 33:8272-8281.
- Smeekens S, Weisbeek, Robinson C (1990)** Protein transport into and within chloroplasts. *TIBS* 15:73-76.
- Stern DB, Gruissem W (1989)** Chloroplast mRNA 3' end maturation is biochemically distinct from prokaryotic mRNA processing. *Plant Mol. Biol.* 13:615-625.

- Sugita M, Sugiura M (1996)** Regulation of gene expression in chloroplast of higher plants. *Plant Mol. Biol.* 32:315-326.
- Taylor WC (1989)** Regulatory interactions between nuclear and plastid genomes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40:211-33.
- Thomson WW, Whatley JM (1980)** Development of nongreen plastids. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 31:375-94.
- Toledo G (1998)** Estudio de la función de la proteína de 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.
- Vain A (1999)** Rapid and systematic accumulation of chloroplast mRNA-binding protein transcripts after flame stimulus in tomato. *Plant Physiol.* 121:517-524.
- Ye L, Li Y, Fukami KK, Go M, Konishi T, Watanabe A, Sugiura M (1991)** Diversity of a ribonucleoprotein family in tobacco chloroplasts: two new chloroplast ribonucleoproteins and phylogenetic tree of ten chloroplast RNA-binding domains. *Nucl. Acid Res.* 19:6485-6490.