



UNAM
POSGRADO

**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

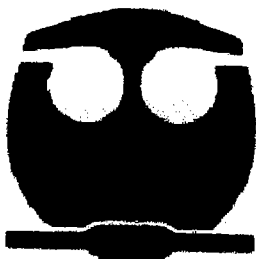
**INTERACCIÓN PROTEINA-RNA EN
CLOROPLASTO: LA cp29 DE *Arabidopsis thaliana***

INFORME DE TRABAJO

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)**

**P R E S E N T A:
CÉSAR DAVID RODRÍGUEZ LÓPEZ**

Tutora: Dra. Herminia Loza Tavera



MÉXICO, D. F.

OCTUBRE, 2004



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.

CONTENIDO

Reconocimientos	i
Contenido	ii
Resumen	1
Abreviaturas	3
Introducción	4
Control de la expresión genética del cloroplasto a nivel postranscripcional	5
Interacción proteína-RNA en la edición	5
Interacción proteína-RNA en el “splicing” de intrones de transcritos del cloroplasto	8
Unión Proteína-RNA en el extremo 5’ de mRNAs de cloroplasto	10
Interacción Proteína-RNA en el 3’ UTR	12
Antecedentes	17
<i>Arabidopsis thaliana</i> como organismo modelo en estudios genéticos	18
Planteamiento del Problema	20
Objetivos	22
Objetivos Generales	22
Objetivos particulares	22
Materiales y Métodos	23
Selección de las plantas transgénicas	23
Siembra de semillas	23
Transplante	23
Extracción de proteínas	24
Western blot	24
Densitometría y análisis de resultados	25
Medición del tamaño y número de hojas	25
Resultados	26
Selección de líneas homocigotos	26
Análisis de los niveles de cp29	30
Análisis fenotípico de las plantas transformadas	34
Discusión	36
Conclusiones	44
Perspectivas	45
Referencias	47
Apéndice	59

Resumen

En plantas superiores algunos mRNAs cloroplásticos sufren una serie de eventos complejos de maduración que incluyen: edición, "splicing" de intrones, corte de RNAs policistrónicos y procesamiento de los extremos 3' y 5' no traducibles (UTR). Los eventos de procesamiento son parte de una ruta post-transcripcional que regula la acumulación diferencial de mRNAs en cloroplasto (Schuster y Grussem, 1991). En espinaca se ha aislado un extracto proteico de cloroplasto capaz de procesar extremos 3'UTRs *in vitro* (Stern y Grussem, 1989). De este extracto se han aislado algunas proteínas de unión a RNA de 24, 28 y 33 kDa (24, 28 y 33RNP; Schuster y Grussem, 1991). Se ha demostrado que la función de la 28RNP es definir el sitio correcto para la maduración del 3'UTR, mientras que la función de las otras RNPs no se ha estudiado (Schuster y Grussem, 1991). La proteína 24RNP está presente en etapas tempranas de desarrollo de la hoja mientras que la 28RNP es más abundante en etapas tardías. Con base en la similitud entre la 24 y la 28RNP se ha propuesto que la 24RNP está involucrada en el procesamiento del mRNA, en la misma ruta en la que participa la 28RNP, pero actuando en etapas tempranas de desarrollo. En *Arabidopsis thaliana* han sido identificadas tres RNPs semejantes a las de espinaca, la cp29, la cp31 y la cp33. Para tener más información acerca de la función de la 24RNP de espinaca, considerando que la cp29 de *Arabidopsis thaliana* podría ser ortóloga de la 24RNP y con el propósito de alterar los niveles de esa proteína se produjeron plantas transgénicas con el gen de la cp29 en orientación sentido y antisentido, clonados bajo el control del promotor constitutivo 35S CaMV (virus del mosaico de la coliflor). Para esto, botones florales de *Arabidopsis* fueron transformados por infiltración al vacío, con *Agrobacterium tumefaciens* que contenía los vectores con las construcciones anteriormente descritas. Las semillas transformadas fueron seleccionadas en medio Murashige y Skoog con 50 µg/ml de kanamicina, posteriormente fueron transplantadas a Metromix 200 y cultivadas en invernadero. Se seleccionaron plantas resistentes a kanamicina por cuatro generaciones registrándose el fenotipo y porcentaje de segregación de estas plantas. Las plantas homocigotas de la generación T₄ fueron utilizadas para analizar por Western blot, los niveles de proteína cp29, empleando un anticuerpo desarrollado contra la 24RNP. Tres proteínas fueron detectadas por este anticuerpo, con tamaños correspondientes a las tres RNPs de *Arabidopsis* (Otha *et al.*, 1995). De acuerdo a los tamaños deducidos a partir de la secuencia de los cDNAs reportados, se determinó que la banda superior correspondía a la cp29. Seis líneas con niveles disminuidos de la cp29, entre 70 a 90%, fueron seleccionadas a partir de 20 transformantes con la construcción antisentido (cuatro líneas) y 18 transformantes con la construcción sentido (dos líneas). No se encontraron plantas con niveles aumentados de la proteína en transformantes con la construcción en orientación sentido, posiblemente debido al fenómeno de co-supresión. Además de la disminución en los niveles de la cp29, todas las líneas mostraron niveles disminuidos de la cp31 y la cp33. El análisis general no mostró fenotipos excepcionales. Sin embargo, se observó que el tamaño de la roseta y el número de hojas fueron menores en las transgénicas en relación al control, mostrando diferencias estadísticamente significativas. Los resultados encontrados sugieren que la alteración en los niveles de las proteínas cp29, cp31 y cp33 de cloroplastos de *Arabidopsis* afectan negativamente el crecimiento de la planta.

Abreviaturas

APS	persulfato de amonio
AS	antisentido
BSA	albúmina de suero bovino
CaMV	virus del mosaico de la coliflor
CRS	proteína de “splicing” de RNA de cloroplasto
kDa	kilo Daltons
kpb	kilo pares de bases
mA	mili Ampers
OE	sobre-expresado
ORF	marco de lectura abierto
PS	fotosistema
RNP	proteína de unión a RNA
ssDNA	DNA de cadena sencilla
SIR	secuencia invertida repetida
UTR	región no traducible
cp29	proteína de cloroplasto de 29 kDa que une RNA
cp31	proteína de cloroplasto de 31 kDa que une RNA
cp33	proteína de cloroplasto de 33 kDa que une RNA

Introducción

Los plastidios son organelos que presentan la maquinaria necesaria para llevar a cabo la biosíntesis de aminoácidos, nucleótidos, lípidos y almidón, así como de varios reguladores de crecimiento (Mullet, 1988). Son organelos semiautónomos que tienen su propio material genético y son capaces de replicarlo. Se presentan en todas las células de plantas autótrofas y se reproducen por división. Los proplastidios se diferencian en distintos tipos como, amiloplastos, cromoplastos, etioplastos y los más estudiados, los cloroplastos. Los diferentes plástidos son muy especializados, por ejemplo: los cloroplastos llevan a cabo el proceso de fotosíntesis, los cromoplastos se encargan de la biosíntesis de carotenoides y otros compuestos que le dan color a flores y frutos y los amiloplastos que realizan la biosíntesis de almidón (Bauer *et al.*, 2001).

El DNA de los plastidios está formado por una doble cadena circular de 120 a 217 kpb, muy similar al DNA de procariontes. El genoma está conformado por aproximadamente 135 genes, los cuales se dividen en tres categorías: proteínas y RNAs involucrados en la transcripción y traducción (RNA polimerasa, tRNAs, rRNAs, proteínas ribosomales), proteínas del aparato fotosintético (Rubisco, PSI, PSII, ATP sintetasa) y proteínas del complejo NADH oxido-reductasa (Mullet, 1988; Rodermel, 2001).

Muchos genes plastídicos están organizados en operones complejos (Doebley, 1998; Miller, 2001). La organización en operones de genes que codifican proteínas de cierto proceso, facilita la coordinación y acumulación estequiométrica de subunidades. Esta organización también facilita la regulación diferencial de genes involucrados en la transcripción/traducción, independientemente de genes involucrados en la fotosíntesis. Sin embargo, otros operones contienen mezclas de genes con diferentes funciones, por ejemplo, *rsp* (proteína ribosomal) es transcrito con *psaA-psaB* (subunidades del fotosistema I, PSI); *rpoA* (subunidad de la RNA polimerasa) y *psbB-psbH* (subunidades del fotosistema II, PSII) son transcritos con *petB-petD* (complejo del citocromo b_6f) (Mullet, 1988; Miller, 2001). La expresión de estos operones involucra múltiples niveles de regulación, incluyendo procesamiento selectivo de los RNAs y estabilidad diferencial.

La interacción proteína-RNA en cloroplastos ocurre a distintos niveles de la regulación genética, desde el nivel transcripcional, hasta el nivel traduccional y postraduccional. Este trabajo se enfocará a analizar las interacciones proteína-RNA que ocurren a nivel

postranscripcional, como marco para comprender la función de una proteína que une RNA y que participa en el procesamiento del extremo 3' no traducible (3'UTR) de mRNAs cloroplásticas: la 24RNP de espinaca y su proteína ortóloga la cp29 de *Arabidopsis*.

Control de la expresión genética del cloroplasto, a nivel postranscripcional

Aunque durante la biogénesis del cloroplasto se observa un incremento en la transcripción de ciertos genes (Mullet, 1988; Bauer *et al.*, 2001) se ha demostrado que la frecuencia de transcripción de algunos otros permanece constante, observándose diferencias significativas en la abundancia de sus mRNAs (Mullet, 1988; Klein *et al.*, 1990; Gruijsem *et al.*, 1993; Monde *et al.*, 2000). Estos resultados indican que la regulación postranscripcional, ya sea al nivel de procesamiento o de estabilidad de los mRNAs, tiene un papel importante en el control de la expresión genética de los cloroplastos.

Estudios de estabilidad de algunos transcritos cloroplásticos revelan que pueden presentar vidas medias de entre 6 y 40 horas. La estabilidad de estos mRNAs depende de que sean correctamente procesados, ya que muchos pre-mRNAs plastídicos están regulados por una serie de complejos procesos de maduración que incluyen el "splicing" de intrones, edición, corte de RNAs policistrónicos y procesamiento de los extremos 3' y 5'. Estos procesos han sido reconocidos como importantes reguladores de la expresión genética en cloroplastos (Siomi *et al.*, 1997).

Interacción proteína-RNA en la edición

En los últimos 15 años, el descubrimiento del proceso de edición del RNA en una gran variedad de organismos, como *Trypanosoma*, plantas, levaduras, moluscos y mamíferos, ha cambiado la clásica versión del flujo de información genética de DNA-RNA-proteína, referido como el dogma central de la biología molecular. La idea de que la secuencia de RNA refleja finalmente la secuencia de DNA, ahora ya no es tan sostenible (Hirose y Sugiura, 2001; Miyamoto *et al.*, 2002).

La edición del RNA se define como el proceso que cambia la secuencia de un transcrito a nivel de nucleótidos individuales. Esto incluye la inserción sitio específico o delección de uno o algunos nucleótidos, así como cambios específicos de nucleótidos. La edición de RNA, en organelos vegetales usualmente restaura la secuencia de aminoácidos

conservados en una proteína, sugiriendo que es un proceso obligatorio en la biosíntesis de proteínas funcionales (Nickelsen, 2003).

La edición en cloroplastos involucra generalmente la conversión de C a U. Sin embargo, la conversión de U a C también ha sido detectada, aunque muy raramente. Ningún otro tipo de edición ha sido detectado en cloroplastos, sugiriendo que en este organelo, este proceso está restringido a transición de pirimidinas. En la Tabla 1 se muestran las características del proceso de edición en cloroplastos (Bock, 2000).

Durante el proceso de edición la unión azúcar-fosfato no se rompe, así como tampoco la unión N-glucosídica entre pentosa y pirimidina, lo cual hace pensar que este cambio debe ocurrir por una conversión enzimática de citidina a uridina. Aunque hasta el momento no se ha podido aislar la proteína que lleva a cabo el proceso de conversión, se ha propuesto que una proteína con actividad de citidina desaminasa, actuando sobre un substrato poliribonucleótido o alternativamente una transaminasa, debe estar llevando a cabo esta reacción. Las evidencias que mostraron el mecanismo de edición por conversión, fueron obtenidas a partir del estudio de la edición en mitocondrias de plantas (Bock, 2000; Tsudzuki *et al.*, 2001).

A partir de estudios de entrecruzamiento con luz ultravioleta se han logrado detectar varias proteínas en tabaco que participan en la edición en cloroplasto: p25, cp31 (Hirose 2001), p56 y p70 (Miyamoto *et al.*, 2002). La proteína p25 se ha descrito como un factor que actúa en trans, específicamente en la edición de *psbL*. La cp31 es una proteína que se había asociado al procesamiento del extremo 3' no traducible. En experimentos realizados con *psbL* y *ndhB* de tabaco, se observó que también participa en la edición de estos mensajeros ya que si se realiza la inmuno-substracción de esta proteína, se produce inhibición de la edición del mRNA y la adición de cp31 recombinante, restaura el proceso (Hirose, 2001). Por lo que, la cp31 es una proteína con funciones múltiples involucrada en varios procesos postranscripcionales (Li y Sugiura, 1990; Sugiura, 2001). Las proteínas p56 y p70 participan específicamente en la edición de *psbE* y *petB* respectivamente, es decir, existe un reconocimiento específico de los sitios de edición para las proteínas reportadas (Miyamoto *et al.*, 2002).

Tabla 1. Características de la edición de RNA en cloroplastos.

Tipos de modificación	En la mayoría de los cloroplastos C ⇒ U En cloroplastos de antoceros U ⇒ C
Sustrato	mRNA
Este proceso se lleva a cabo	A nivel post-transcripcional
Frecuencia	En maíz esta reportado que aproximadamente hay 25 sitios de edición en el genoma plastídico (0.02% de los nucleótidos)
Posición en la cual se da la mayoría de los cambios	Segunda posición
Cambio de codón	Frecuencia alta UNC ⇒ UUN Ser ⇒ Phe/Leu CCN ⇒ CUN Pro ⇒ Leu Baja frecuencia GCN ⇒ GUN Ala ⇒ Val ACH ⇒ AUH Thr ⇒ Ile
Consecuencia	Cambio del aminoácido que codifica (restauración y conservación de residuos de aminoácidos) Creación de codón de inicio ACG ⇒ AUG Creación de codón de término CRR ⇒ URR Eliminación de codón de término URR ⇒ CRR Sitios de edición silenciosos NNC ⇒ NNU
Filogenia/evolución	Edición en todas las líneas de plantas superiores y en briofitas No edición en cianobacterias, algas y algunas hepáticas

Adaptado de Bock, 2000.

Hasta el momento en el genoma de cloroplasto de tabaco no existe el suficiente número de ORFs (marcos de lectura abiertos) necesarios para codificar todas las posibles proteínas que participan en el proceso de edición, sobre todo si se toma en cuenta que este proceso puede ser muy específico. Por ello se deduce que muchas de estas proteínas deben ser importadas desde el citoplasma (Bock y Koop, 1997).

El reconocimiento de los sitios de edición pueden ser afectado por la combinación de las diferentes proteínas de unión a RNA en cloroplasto (ejem. cp31) y los diferentes factores que participan en trans, por ejemplo p25. (Hirose, 2001; Miyamoto *et al.*, 2002).

Aunque la naturaleza de las proteínas que llevan a cabo el proceso de edición es desconocida, se sabe que presentan al menos dos dominios en común: uno para el reconocimiento del elemento en cis (secuencia a editar) y otro dominio catalítico o sitio de

contacto con el factor catalítico, lo que facilita la desaminación del residuo de citidina a ser editado (Miyamoto, 2002).

En conclusión, en la edición de los mRNAs de cloroplastos: i) los codones sin sentido son reparados a codones con sentido, ii) más del 95% de los codones que contienen sitios de edición son convertidos a formas conservadas para traducir proteínas funcionales y iii) una secuencia de intrón puede ser corregida para que el “splicing” pueda llevarse a cabo correctamente (Kugita *et al.*, 2003).

Interacción proteína-RNA en el “splicing” de intrones de transcritos del cloroplasto

Muchos genes eucariotes contienen intrones que deben ser escindidos del pre-mRNA en el núcleo para producir mRNAs funcionales. En *Arabidopsis* 18 y 12% de los genes codificados en los genomas del cloroplasto y la mitocondria, respectivamente, contienen intrones. La escisión (“splicing”) correcta y eficiente de los intrones en plantas es un paso crítico de la regulación de la expresión genética, al igual que en otros eucariotes. La estructura de los exones-intrones y los mecanismos básicos de escisión son similares en eucariotes. Se ha observado que un complejo de alto peso molecular participa en la escisión de intrones en cloroplastos (Rivier *et al.*, 2001; Nickelsen, 2003).

En general los intrones se clasifican en cuatro grupos, con base en los rasgos estructurales primarios y secundarios. En mitocondrias y cloroplastos se han identificado intrones de los grupos I y II. En estos grupos puede existir auto-”splicing” bajo condiciones no biológicas, es decir altas concentraciones de sales, además necesitan Mg^{2+} como cofactor (Saldanha *et al.*, 1993).

Mediante técnicas de entrecruzamiento con luz ultravioleta y geles de retardo se han aislado algunas proteínas nucleares que participan en el procesamiento de intrones *in vivo*. En el cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii* se han identificado dos proteínas, de 31 y 61 kDa, que co-precipitan en un complejo de alto peso molecular unido a intrones de tipo II (Bunse *et al.*, 2001). Otra proteína identificada es Raa3, la cual se encuentra formando un complejo de 1,700 Da en el que, además de Raa3, se encuentran otros componentes que todavía no han sido caracterizados. Raa3 es una proteína soluble de 176 kDa, que se encuentra distribuida en el estroma del cloroplasto. El residuo amino terminal de esta proteína es la parte funcional, ya que si se elimina este residuo la proteína pierde su función de factor de

“splicing” (Rivier *et al.*, 2001). Raa1 y Raa2 son otras dos proteínas que participan en el proceso de “splicing”. A diferencia de Raa3, estas dos proteínas se encuentran asociadas a la membrana del cloroplasto. Raa1 y Raa2 forman parte de un complejo de alto peso molecular de 400-500 kDa (Perron *et al.*, 2004).

Se han aislado algunas proteínas codificadas en el núcleo que también participan en el “splicing” de intrones del cloroplasto Maa1 y Maa2. Maa2 es una proteína aislada a partir de mutantes deficientes en el “splicing” de *psaA* (Perron *et al.*, 1999). Esta proteína presenta similitud con la pseudouridina sintetasa. TruA y RsuA son dos proteínas cuya actividad de pseudouridina sintetasa está bien caracterizada, y en las cuales se han identificado algunos aminoácidos (D171, D141 y K142) que son importantes para su actividad. Al realizar mutaciones en estos residuos en Maa2 (D171S, D171G, D141E, D141S, K142R y K141I), la actividad de “splicing” no es afectada, lo cual indica que la actividad de pseudouridina sintetasa no es importante para el proceso de “splicing” de intrones tipo II de *psaA*. No está clara la función de estos dominios en esta proteína. Sin embargo, estas características sugieren una proteína bifuncional (Perron *et al.*, 1999), como es el caso de CBF5, NAP57, MFL y CDK1, las cuales no sólo están involucradas en la pseudouridinación, sino también en el procesamiento del pre-rRNA. Se sabe además que son un grupo de proteínas involucradas en diferentes aspectos de la biogénesis de ribosomas en *Drosophila* (Giordano *et al.*, 1999).

Durante la búsqueda mutantes deficientes en el “splicing” de cloroplasto se aislaron dos genes involucrados en este proceso, *crs1* (chloroplast RNA “splicing” 1) el cual está involucrado en el “splicing” del gen de la ATP sintetasa; y *crs2* que participa en el “splicing” de varios intrones del tipo II (Jenkins *et al.*, 1997). La proteína CRS1 presenta tres copias de un dominio repetido de 10 kDa, del cual se desconoce su función. Este dominio está presente en algunas proteínas de *Arabidopsis*, e interesantemente también en proteínas de eubacterias (*E. coli*) y archeas (*Methanococcus jannaschii*). Esto indica que *crs1* proviene de un ancestro común preservado en la evolución de plantas y algas (Till *et al.*, 2001).

CRS1, además de participar en el “splicing” de intrones, también está involucrado, en el proceso de traducción ya que, en mutantes de este gen se observa una alteración en la formación de algunos complejos fotosintéticos. Se realizó un estudio con *rbcL* y *atpB/E* y se encontró una menor cantidad de ribosomas unidos a *rbcL*, lo cual genera desestabilización del mensajero (Till *et al.*, 2001). Esto se podría explicar sugiriendo que el efecto de CRS1 se basa

en la ineficiencia del “splicing” de algunos de los genes de proteínas ribosomales y tRNAs. Sin embargo, en estos mutantes el proceso de “splicing” en estos genes fue normal. Estos datos sugieren que CRS1 es una proteína bifuncional que es necesaria para el “splicing” de *atpF* y que también participa en la traducción en el cloroplasto (Jenkins *et al.*, 1997).

CRS2 es una proteína similar a la peptidil-tRNA hidrolasa (Jenkins y Barkan, 2001), pero no presenta los aminoácidos conservados para llevar a cabo esa función. Aunque esta proteína participa en el “splicing” de intrones del tipo II no se había observado que tuviera alguna preferencia o selección. Mediante la técnica del doble-híbrido se han aislado dos proteínas que se unen a CRS2, CAF1 y CAF2 (CRS2 associated factors). Estas dos proteínas también son factores de “splicing” que se unen a intrones del tipo II *in vivo*. CAF1 y CAF2 presentan algunas características muy semejantes al factor CRS1, específicamente, poseen los dominios de 10 kDa anteriormente mencionados. Estudios de co-precipitación han demostrado que CAF1 y CAF2 no forman parte de un complejo con CRS1, interactúan con CRS2 formando un complejo en el cual, dependiendo de que subunidad CAF esté unida, es el intrón que se procesará (Ostheimer *et al.*, 2003).

MARK es otra proteína que se ha propuesto que está involucrada en el “splicing”. Esta proteína se encuentra ausente en los mutantes allostriants de cebada, los cuales presentan una deficiencia en el “splicing” de intrones tipo IIA (Vogel *et al.*, 1999).

Unión Proteína-RNA en el extremo 5' de mRNAs de cloroplasto.

La región 5' de los transcritos de cloroplasto también sufre procesamiento postranscripcional. Esta región participa en la estabilidad de los mensajeros y, además, es el sitio donde se inicia la traducción. Los mensajeros en cloroplasto no poseen un 5' cap como sucede con los mensajeros eucarióticos (Monde *et al.*, 2000). Se han hecho estudios utilizando diferentes 5'UTRs de cloroplasto de espinaca y se ha podido demostrar que existe un complejo de proteínas que participa en el procesamiento de esta región (Robida *et al.*, 2002). Se han podido detectar dos proteínas que se unen a la región 5'UTR de *psbA* de *Arabidopsis thaliana*, las cuales tienen un tamaño de 30 y 47 kDa. Estas proteínas se unen a la región 5' dependiendo del estado redox del sistema. Se demostró que en estado oxidado se elimina la actividad de unión de estas proteínas (Shen *et al.*, 2001). Este mecanismo es importante porque la regulación redox ha sido descrita como un factor importante que controla los niveles

de expresión de genes que participan en la fotosíntesis (Pfannschmidt *et al.*, 1999). Se ha descrito que p47 se une al extremo 5' cuyo éste ha sido procesado y tiene un tamaño de 66 nucleótidos, además de que se une de manera dependiente de luz a *rbcL* (McCormac *et al.*, 2001).

Se han clonado tres proteínas nucleares de *C. reinhardtii* las cuales funcionan sobre el extremo 5'UTR de genes de cloroplasto. Estas proteínas son Nac2 y Mbb1, las cuales participan en la estabilidad de *psbD* y *psbB* respectivamente (Boudreau *et al.*, 2000; Vaistij *et al.*, 2000), además de Tbc2 (Auchincloss *et al.*, 2002), la cual regula el inicio de la traducción de *psbC*. Se ha demostrado que estas tres proteínas forman parte de un complejo de alto peso molecular el cual está unido a moléculas de RNA, aunque queda todavía por descubrir si interactúan directamente con los transcritos (Boudreau *et al.*, 2000; Auchincloss *et al.*, 2002). En espinaca se ha demostrado que la proteína ribosomal S1, interactúa con la región 5' de *psbA* (Shteiman-Kotler *et al.*, 2000).

Utilizando una cromatografía de afinidad de RNA, con el 5'UTR de *psbA* como ligando, fue aislado un complejo de proteínas de cuatro subunidades: RB47, RB60, RB55 y RB38 (Bruick *et al.*, 1999). Empleando ensayos de entrecruzamiento con luz ultravioleta, se demostró que solamente RB47 se une directamente con el RNA. RB60 es una disulfuro isomerasa la cual modula la unión de p47. p47 es una proteína de unión a poliA (Kim *et al.*, 2002). Recientemente una nueva proteína de unión a RNA, llamada RB63 se identificó en *C. reinhardtii*, la cual forma parte de un complejo de peso molecular de 700 kDa aproximadamente. Su unión es dependiente de la presencia de siete adeninas consecutivas que se presentan de 14 a 18 nucleótidos hacia arriba del AUG de *psbA*. Se especula que esta proteína puede estar participando en el control traduccional del gen *psbA* en *C. reinhardtii*. Esta proteína representa el primer reporte de una proteína de unión a RNA asociada a la membrana tilacoidal (Ossenbühl *et al.*, 2002).

Todavía es necesario realizar más estudios para conocer las proteínas que forman parte del complejo de unión al 5'UTR, así como la función que lleva a cabo cada una de ellas y bajo que condiciones fisiológicas realizan su función, así como determinar que otras proteínas participan en la regulación de este proceso.

Interacción Proteína-RNA en el 3'UTR

En plantas, lo mismo que en animales y levaduras, la maduración del extremo 3' no traducible (3'UTR) de los mRNAs es un evento importante ya que el procesamiento incorrecto lleva a la degradación de estas moléculas (Deng *et al.*, 1987; Sugiura, 1992). Muchos de los transcritos cloroplásticos, tanto mono- , como policistrónicos están flanqueados en el extremo 3' por una secuencia invertida repetida (SIR) que forma una estructura "tallo-asa" con un ΔG de plegamiento muy negativo, lo que la hace muy estable (Stern *et al.*, 1989). Esta estructura es similar a la que está involucrada en la terminación de la transcripción en procariontes (Stern *et al.*, 1987). Dado el origen endosimbiótico de los cloroplastos, la idea inicial fue que esas estructuras tendrían una función semejante a la función que tienen en bacterias. Sin embargo, los experimentos de Stern y colaboradores (1989) sugieren que esta estructura actúa como una barrera, previniendo la degradación del mensaje. Por otro lado, el análisis de estabilidad de los mRNAs de cloroplasto, que presentan diferentes 3'UTRs ha demostrado que la vida media de los mensajeros no depende únicamente de la presencia de esta estructura. Las observaciones realizadas sugieren que, además de la estructura "tallo-asa", existen genes nucleares cuyas proteínas son exportadas al cloroplasto y que están involucradas en el procesamiento del extremo 3' de los mRNAs en este organelo (Schuster y Grussem, 1991; Hayes *et al.*, 1996; Barkan, 2000). Los eventos de procesamiento de RNA en el 3'UTR son parte de una ruta postranscripcional que regula la acumulación diferencial de mRNAs cloroplásticos (Schuster y Grussem, 1991).

Diferentes tipos de actividades de procesamiento en el 3'UTR de mRNAs, por ejemplo, maduración del extremo 3' y corte de los mensajes policistrónicos, han sido identificadas en extractos de cloroplasto de espinaca, aunque las enzimas involucradas han sido poco caracterizadas (Sugita y Sugiura 1996). A partir de cloroplastos de espinaca se ha aislado un extracto proteico capaz de llevar a cabo procesamiento de los extremos 3'UTRs de mRNAs *in vitro*. En estos extractos se han identificado varias proteínas involucradas en este proceso. Una de ellas es una proteína de 100 kDa con actividad de polinucleótido fosforilasa (PNPasa) o exonucleasa 3'-5' (Hayes *et al.*, 1996) y que también tiene la actividad de poli-A polimerasa (Yehudai-Rasheff *et al.*, 2001; Baginsky *et al.*, 2002). Una proteína de 67 kDa, que originalmente se identificó como la endoribonucleasa E (RNAsa E; Hayes *et al.*, 1996) que, recientemente, se ha relacionado con GroEL (Baginsky *et al.*, 2003) y cuya función no ha sido

determinada y una proteína de 55 kDa que se ha propuesto que previene la remoción endonucleolítica de la estructura de tallo-asa (Hayes *et al.*, 1996; Tabla 2).

En cuanto a la *csp41* se han empezado a caracterizar dos proteínas: *csp41a* (Yang *et al.*, 1996) y *csp41b*, la cual se describió a partir de conocer la secuencia completa del genoma de *Arabidopsis thaliana*. CSP41 fue originalmente descrita como una proteína que forma parte del complejo de procesamiento del extremo 3' de los mensajeros de cloroplasto. In vivo se ha observado que la disminución en los niveles de *csp41a* afecta la eficiencia de procesamiento del extremo 3' (Monde *et al.*, 2000) y con ello disminuye el porcentaje de degradación de *rbcl*, *petD* y *psbA*, en comparación con el silvestre (Bollenbach *et al.*, 2003). En cuanto a *csp41b* todavía se desconoce su función.

Tabla 2. Proteínas identificadas en el complejo de procesamiento de 3'UTRs en cloroplasto de *Spinacea oleracea*.

Tamaño	Proteína	Homología	Función	Referencia
100 kDa	100RNP	PNPasa	3'-5' exonucleasa Poly A polimerasa	Hayes <i>et al.</i> , 1996
67 kDa	P67	Semejante a GroEL de <i>E. coli</i>	Desconocida	Hayes <i>et al.</i> , 1996
55 kDa	55RNP		Previene el corte hacia arriba de la estructura "tallo asa"	Hayes <i>et al.</i> , 1996
41 kDa	CSP41	Edonucleasa	Endonucleasa	Yang <i>et al.</i> , 1996
33 kDa	33RNP	cp33 <i>A. thaliana</i>	Desconocida, probablemente podría estar regulando la actividad de la 100RNP	Hsu-Ching y Stern, 1991.
28 kDa	28RNP	cp31 <i>A. thaliana</i>	Dirige el correcto procesamiento del extremo 3'	Schuster y Gruissem, 1991
24 kDa	24RNP	cp29 <i>A. thaliana</i>	Desconocida, probablemente da estabilidad al extremo 3' durante el procesamiento	Hayes <i>et al.</i> , 1996; Loza-Tavera <i>et al.</i> sin publicar

Además de las proteínas descritas, se han identificado en el extracto otras tres proteínas pequeñas de unión a RNA con tamaños aproximados de 33, 28 y 24 kDa (Schuster y Gruissem, 1991). Solamente se ha determinado la función de la 28RNP, la cual está involucrada en el correcto procesamiento del extremo 3' de los mRNAs de cloroplastos. Las proteínas de 28 y 24 kDa que se unen a RNA (RNPs) tienen una secuencia y estructura muy semejante (Fig. 1). Estas proteínas son codificadas en el núcleo, presentan un péptido señal

que las dirige hacia el cloroplasto, un dominio amino terminal ácido y dos dominios de unión a RNA, rasgos característicos de las RNPs de cloroplasto. La expresión de los genes que las codifican se induce por luz y se expresan diferencialmente durante el desarrollo, la 24RNP presenta una mayor expresión en hojas jóvenes a diferencia del patrón de expresión del gen de la 28RNP que se expresa principalmente en hojas maduras (Li y Sugiura 1990; Schuster y Gruissem 1991; Mieszczak *et al.*, 1992; Ohta *et al.*, 1995; Cook y Walker, 1992; Hayes *et al.*, 1996).

Dominio ácido					
28RNP	VAQTSEWEQ	EGSTNAVLEG	ESDPEGVSW	GSETQVSDEG	VEGGQGFSEP
24RNP	••••••••E	SISSSFVRHV	RISSE•••F	EQEEDVMGDD	AGRQPNFS••
Primer dominio de unión a RNA					
28RNP	PEEAK	<u>LFVGNL</u>	PYVDSEKLAG	IFDAAGVVEAE	VIYNRETDRSR <u>GFGFVTM</u>
24RNP	•PDLK	<u>IFVGNL</u>	PFNDVSAELAG	LFGAGTVEMVE	VIYDKLTGRSR <u>GFGFVTM</u>
Región interdominio					
28RNP	STVEEAEKAV	ELLNGYDMDG	RQLTVNKAAP	RG•••SPERA	PRGDF
24RNP	SSVEEVEAAA	QQFNNYELDG	RTLRVTEDSH	KDMLPRVES	ECDSF
Segundo dominio de unión a RNA					
28RNP	EPSCR	<u>VYVGNL</u>	PEDVDTSRLEQ	FSEHGKVVSAR•	VVSDREGRSR <u>GFGFVTM</u>
24RNP	GSSNR	<u>VHVGNL</u>	SWKVDDALK•	FSETDGVVEAKV	IYDRDTGRSR <u>GFGFVTY</u>
28RNP		SSEVNVNDA	IAALDGQTL	DGRAVRVNVA	EERPRRAF
24RNP		NSANEVNTA	IESLDGVDL	NGRSIRVTAA	ERQRRG••

Figura 1. Comparación de la secuencia de aminoácidos de las proteínas 28RNP y 24RNP de *Spinacea oleracea*. Estas proteínas presentan un 56% de identidad (BLAST). Las regiones conservadas en los dominios de unión a RNA están subrayadas.

En *A. thaliana* se describió la proteína cp29 (Ohta *et al.*, 1995) la cual tiene un 86% de identidad (BLAST) con la 24RNP de espinaca. El gen que codifica la cp29, *athcp29*, está formado por cuatro exones y tres intrones. Este gen codifica un péptido de 334 aminoácidos (a.a.). En los primeros 66 a.a. la secuencia es rica en residuos de serina y treonina, presenta una carga neta positiva, mostrando rasgos típicos de un péptido de tránsito. La proteína

madura está formada por 268 a.a. con un tamaño de 28,295 Da. Los primeros 32 a.a. de la proteína madura son ricos en ácido glutámico y ácido aspártico constituyendo un dominio amino terminal ácido. Además, presenta dos dominios de unión a RNA flanqueados por secuencias consenso reportadas para otras RNPs (Bar-Zvi *et al.*, 1992; DeLisle, 1993; Cheng *et al.*, 1994; Otha *et al.*, 1995). Una característica sobresaliente de esta proteína es su región inter-dominios, la cual es rica en glicina y serina, presentando tres secuencias repetidas en tandem del motivo GSERGGGY, y un motivo consistente en seis repeticiones del dipéptido GS.

Dominio ácido					
24RNP	E	SISSSFVRHV	RISSE	FEQEEDVMGDD	AGRQPNFS
cp29	YPSRFV	RNVAVSSDFE	VEEDD	MFADGDDSAPV	ERNSFSPD
Primer dominio de unión a RNA					
24RNP	PDLK	<u>IFVGNL</u>	PFNDVSAELAG	LFG•AGTVEM	VE VIYDKLTGRS <u>RGFGFVTM</u>
cp29	••LK	<u>LFVGNL</u>	SFNVDSAQLAQ	LFESAGNVEM	VE VIYDKVTGRS <u>RGFGFVTM</u>
Región interdominio					
24RNP	SSVEEVEAAA	QQFNYYELDG	RTLRTEDSH	KDMLPRVES	ECDSF
cp29	PKREESFSRGP	SRGGYGSERGGYGSERGGYGSERGGYGSQR	SGGGYGSQRSS	YSGSGSGSGSGSG	
Segundo dominio de unión a RNA					
24RNP	GSSNR	<u>VHVGNL</u>	SWKVDDDALK	•FSETDGVVEAK	VIYDRDTGRSR
cp29	•••NR	<u>LYVGNL</u>	SWGVDMALE	NLFNEQKQVVEA	RVIYDRDSGRS
24RNP		<u>GFGFVTY</u>	NSANEVNTA	IESLDGVDL	NGRSIRVTAA ERQRRG
cp29		<u>KGFGFVTL</u>	SSSQEVQKA	INSLNGADL	DGRQIRVSEA EARPPRG

Figura 2. Comparación de las secuencias de la 24RNP y la cp29. La cp29 presenta una región rica en glicina en el interdominio la cual no está presente en la 24RNP.

En 1996, Hayes y colaboradores describieron que un complejo de alto peso molecular estaba implicado en el procesamiento de los mRNAs de cloroplasto. Este complejo está conformado por varias proteínas, algunas formando parte del complejo, como la 100RNP y la

33RNP la cual se ha sugerido que está regulando a la 100RNP y otras asociadas a él, como la 28 y la 24RNPs.

En investigaciones recientes se ha comprobado que la proteína p100 efectivamente eluye en un complejo de alto peso molecular de 580-600 kDa, pero este complejo está formado sólo por esa proteína, es decir aparentemente es un hexámero. Los experimentos realizados en geles nativos y desnaturizantes han mostrado que este complejo está formado por aproximadamente tres subunidades de p100 (Baginsky *et al.*, 2001). La estructura cristalizada de la PNPasa de *Streptomyces antibioticus* ha sido determinada (Symmons *et al.*, 2000). Esta enzima está organizada como un trímero cuyas subunidades se ensamblan formando un canal, sugiriendo un posible modo de procesamiento en el cual la degradación del RNA es facilitada por los cambios estructurales del RNA cuyo pasa a través de este canal (Baginsky *et al.*, 2001).

Antecedentes

Los cloroplastos son organelos de las células vegetales que durante mucho tiempo han acaparado la atención de los fisiólogos por las funciones metabólicas que en ellos se llevan a cabo, principalmente la fotosíntesis. A principios de los años sesenta se confirmó un hecho que pocos años atrás había sido una sospecha: la existencia de material genético en su interior. Ese descubrimiento desencadenó una serie de estudios destinados a demostrar las características y el papel que este genoma organelar desempeña en la regulación del desarrollo de las plantas. Actualmente existen numerosos estudios sobre la organización genómica, la organización genética, el contenido génico y la regulación de la expresión del genoma cloroplástico de una gran cantidad de especies vegetales y de algas (Palmer, 1985; Sugita y Sugiura, 1996).

Existen diferentes estudios que se han realizado para conocer los elementos que están participando en el procesamiento, maduración y estabilidad de los mensajeros cloroplásticos. A partir de los ochenta se han realizado diferentes estudios relacionados con este tema.

Li y Sugiura en 1990, por medio de una columna de afinidad (ssDNA) lograron aislar tres proteínas de cloroplasto de tabaco de 28, 31 y 33 kDa, (cp28, cp31 y cp33), que presentan dos dominios de unión a RNA, un péptido de tránsito, y un dominio ácido en la región amino terminal de la proteína madura. Schuster y Grussem en 1991 describieron un extracto proteico que participa en el procesamiento y la estabilidad de los mRNAs de cloroplasto. Así mismo, identificaron una proteína de 28 kDa (28RNP) que presenta las mismas características que las proteínas descritas en tabaco y cuya substracción del extracto impide el procesamiento correcto y estabilidad de algunos mensajeros.

DeLisle en 1993 y Cheng *et al.*, en 1994 describen las proteínas de 31 kDa (31RNP) y 33 kDa (33RNP) respectivamente en *Arabidopsis thaliana*, que presentan una alta identidad con las RNPs de espinaca (Schuster y Grussem, 1991), tabaco (Li y Sugiura, 1990) y maíz (Cook y Walker, 1992) descritas anteriormente. Estas proteínas también tienen dos dominios de unión a RNA y una región amino terminal ácida.

En 1994, G. Schuster y su grupo (Lisitsky *et al.*, 1994) iniciaron la caracterización de la proteína 28RNP de cloroplasto de espinaca, encontrando que el dominio ácido participa en la estabilización de la unión de la proteína completa al RNA, ya que ésta se une con mayor

afinidad que la proteína truncada cuyo le falta el dominio. Pero si se tienen solo los dos dominios de unión a RNA existe una mayor afinidad (siete veces más), que con la proteína completa.

Para 1995, el grupo de Sugiura (Otha *et al.*, 1995) reporta los cDNAs de tres proteínas de unión a RNA de cloroplastos de *Arabidopsis thaliana* (cp29, cp31 y cp33 kDa). La cp29, probable ortóloga de la 24RNP de espinaca, además de las secuencias de unión a RNA y el dominio ácido, presenta una región rica en glicina entre las dos regiones de unión a RNA. La proteína de 31 kDa presenta una alta similitud con la proteína 28RNP de espinaca. Al igual que las proteínas RNP de espinaca reportadas, las de *Arabidopsis* se expresan más en tallo y hojas, que en raíz.

Kudla *et al.*, (1996) reportan que la poliadenilación del mRNA y de intermediarios está asociada con la degradación. Los productos cuyo son poliadenilados son susceptibles de ser atacados por una endoribonucleasa, para su subsecuente degradación por la enzima p100 (PNPasa). Ellos demostraron que la poliadenilación ocurre *in vivo* y revelaron que existe un incremento de la poliadenilación y de la degradación de mRNA en la oscuridad.

***Arabidopsis thaliana* como organismo modelo en estudios genéticos**

Arabidopsis thaliana es una planta de la familia Crucífera, con hojas pequeñas organizadas en roseta, cuya inflorescencia consiste en una racimo de flores, que se genera en la parte central de la planta y tiene un tamaño aproximado de entre 10 y 20 cm de altura (Figura 3). La inflorescencia contiene una serie de flores que constan de cuatro sépalos rodeando los órganos sexuales y alternando con cuatro pétalos blancos. Las flores maduras son de aproximadamente 3 mm. Normalmente existe autofecundación. Después de fertilizado el ovario se alarga y desarrolla un fruto llamado silicua, que contiene entre 30 a 60 semillas. Las semillas son pequeñas con un peso aproximado de 20 µg. Estas semillas pueden ser almacenadas en condiciones de baja humedad por varios años sin que pierdan su viabilidad (Meyerowitz, 1987).

Su tamaño pequeño y como consecuencia la capacidad de cultivar un gran número de organismos en un espacio limitado, el tiempo generacional corto, la gran cantidad de semillas que produce, el crecimiento rápido y la autofecundación, hacen de *Arabidopsis thaliana* un buen modelo para estudios de genética (Meyerowitz, 1987). Las investigaciones genéticas con

Arabidopsis se iniciaron en 1940 por Laibach. Hoy en día se han realizado muchos estudios para llegar a conocer algunos procesos implicados en el desarrollo de las plantas superiores utilizando como modelo a *Arabidopsis thaliana*, y es la primera planta que se conoce la secuencia completa de su genoma (Lorkovic y Barta, 2002).



Figura 3. Planta silvestre de *Arabidopsis thaliana*. Consiste de una roseta de la cual surge la inflorescencia de la parte apical. Las flores son pequeñas y blancas y los frutos llamados silicuas, contienen las semillas.

Planteamiento y estrategia experimental

Una estrategia que ha sido muy empleada para determinar la función de una proteína ha sido la estrategia de antisentidos. En términos generales, la estrategia consiste en introducir la secuencia del gen de interés en orientación antisentido, bajo el control de un promotor constitutivo. Esta secuencia al transcribirse, hibrida con un blanco y bloquea la expresión del gen. El bloqueo de la expresión puede ser a diferentes niveles, en algunas ocasiones se une a la cadena molde del DNA que codifica la proteína de interés, impidiendo la transcripción, en otras ocasiones estimula la degradación por nucleasas específicas al formar híbridos DNA:RNA o RNA:RNA. El objetivo principal del uso de antisentidos es bloquear la expresión de un gen para así crear una línea celular o un organismo transgénico en el cual exista una pérdida o decremento de la proteína que codifica el gen en estudio, generándose un fenotipo que permita investigar la función de esta proteína en el desarrollo o en algún proceso celular.

Con el objeto de indagar sobre la función que desempeñan las proteínas de unión a RNA en el sistema de degradación/procesamiento de mRNAs de cloroplasto, específicamente sobre la función de la proteína 29RNP de *Arabidopsis thaliana* (semejante a la 24RNP de espinaca), se emplearon las estrategias de bloqueo y sobre-expresión del gen correspondiente. Para esto se transformaron plantas de *A. thaliana*, utilizando el sistema de infiltración al vacío, con a) el gen de la 29RNP clonado en fase y en la orientación adecuada bajo el control del promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), utilizando el sistema de *Agrobacterium tumefaciens* (sobre-expresión), y b) el gen de la 29RNP clonado bajo el control del mismo promotor pero en orientación antisentido (plantas antisentido). Las semillas de estas plantas (generación T₀), fueron sembradas en un medio de selección (MS con kanamicina 50 µg/ml), transplantadas a tierra y las semillas de estas plantas resistentes fueron colectadas nuevamente. Como control de la transformación se analizaron plantas que se transformaron solamente con el vector SLJ7292 sin inserto (Ver apéndice).

Las semillas con las cuales se empezó a realizar el estudio pertenecen a la generación T₀ estas fueron llevadas hasta la generación T₄ obteniendo líneas puras en las cuales se realizaron análisis de Western blot para determinar los niveles de la 29RNP en extractos de plantas independientes utilizando el anticuerpo anti-24RNP y poder determinar que líneas

presentaban una alteración en los niveles de proteína 29RNP. Se midió el tamaño de la roseta y de las hojas en 15 plantas de cada línea para determinar si existían diferencias entre ellas.

El trabajo de subclonación y transformación de *A. thaliana* fue llevado a cabo en el Department of Plant y Microbial Biology de la University of California at Berkeley (USA) (Loza-Tavera, H., 1996, no publicado). El análisis fenotípico y bioquímico de las plantas constituyen los resultados presentados en este trabajo de maestría y fueron realizados en las instalaciones del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas de la Facultad de Química de la UNAM.

Objetivos

Objetivo general

Caracterización de las plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* con el gen *athcp29* que codifica la cp29 (ortóloga de la 24RNP de espinaca) en sentido y antisentido.

Objetivos particulares

1. Cultivar *A. thaliana* silvestre y transformadas con las construcciones antes mencionadas.
2. Determinar los niveles de expresión de la cp29 en las plantas transgénicas resistentes a kanamicina.
3. Caracterizar fenotípicamente las plantas con niveles alterados de la proteína cp29.
4. Medir el tamaño de la roseta y número de hojas en las plantas con niveles alterados de la proteína cp29.

Materiales y métodos

Selección de las plantas transgénicas

La selección de las plantas transgénicas se realizó siguiendo como marcador la resistencia a kanamicina. Las semillas se sembraron en medio Murashige-Skoog (MS) (ver apéndice) con 50 µg/mL de kanamicina.

Siembra de semillas

1. Pesar aproximadamente 20 mg de semillas
2. Esterilizarlas en un tubo con 10 mL de isopropanol, decantarlas y tirar el alcohol
3. Agregar una solución con 50% de cloro comercial, 50% de agua estéril y 0.05% de tween 20. Agitar y decantar las semillas.
4. Enjuagar tres veces con agua estéril.
5. Para sembrar se agregaron 1 mL agarosa al 0.1% estéril en un tubo eppendorff, se agitó y se incubó a 4° C durante dos días para darle el tratamiento de rompimiento de dormancia. Posteriormente se sembraron semilla por semilla hasta cubrir toda la caja. Este procedimiento permitió tener a las semillas, separadas y que estas estuvieran en contacto con el medio y con el antibiótico.

Las semillas no transformadas eran sensibles a la kanamicina, germinaban pero las hojas eran albinas y las plántulas morían.

Transplante

1. Cada planta resistente al antibiótico fue transplantada individualmente en macetas de 5x5x10 cm conteniendo como substrato Metro Mix 200
2. Las macetas se cubrieron con un domo y se colocaron en la cámara de crecimiento la cual tenía un fotoperiodo de día largo (16h luz y 8h oscuridad) y una temperatura de 24° C, durante una semana.
3. Al cuarto día de ser transplantadas se levantó un poco el domo para que se eliminara un poco de humedad.
4. Al sexto día se descubrieron las macetas pero se mantuvieron dentro de la cámara.

5. Si las plantas eran utilizadas para obtener tejido se mantenían dentro de la cámara, pero si era para producir semilla estas eran sacadas al invernadero.

Se obtuvo la semilla de las plantas resistentes durante tres generaciones. A la tercera generación se colectaron las semillas de las plantas que presentaban el 100% de resistencia a kanamicina y se tomaron como homocigotas dominantes y se utilizaron para realizar el estudio.

Extracción de proteínas

El análisis para determinar los niveles de 29RNP se realizó en las líneas homocigóticas T₄. A partir de tres semanas de desarrollo de las plantas se obtuvieron extractos de proteína empleando toda la parte aérea de la planta. Las plantas se colectaron individualmente. Se pesa el tejido y se muele con nitrógeno líquido en un mortero, todo se debe realizar en frío para evitar la acción de las proteasas. Se siguió el siguiente protocolo:

1. Se agrega el buffer de extracción (Ver apéndice) en una relación 1:1 con respecto a la masa de tejido, fresco.
2. Se centrifuga y se recupera el sobrenadante, al cual se le mide la concentración de proteína por el método de Bradford utilizando el reactivo, Bio-Rad (No. de catálogo 500-0006) se realizó una curva estándar con albumina sérica de bovino (BSA) en un rango de 2 a 25µg.

Western blot

La técnica de Western blot consiste en la separación de un extracto de proteínas que son separadas en un gel de poliacrilamida desnaturalizante y transferidas a un soporte sólido como una membrana de nitrocelulosa o nylon (Towbin *et al.*, 1979). Esta membrana es incubada con un anticuerpo específico que reconoce a la proteína de interés. Este anticuerpo a su vez, será reconocido por un segundo anticuerpo el cual está acoplado a una enzima que al agregarle su sustrato generará un producto luminoso. Esta luminiscencia se detectó al poner en contacto con una película fotográfica.

Procedimiento

1. Se preparó un gel de SDS-PAGE al 15% (Laemmli, 1970) Ver apéndice.
2. Se prepararon las muestras de proteínas y se les adicionó el buffer de carga (Ver apéndice).
3. Se corrió el gel a 20mA durante 1.5 horas.

4. Se sacó el gel y se montó la electrotransferencia (Ver apéndice).
5. Posteriormente se sacó la membrana se dejó secar durante 10 min para fijar las proteínas.
6. La membrana se rehidrató con metanol, se lavó con agua y se puso a bloquear con leche.
7. Luego se incubó toda la noche con el primer anticuerpo, anti 24RNP, diluido en leche al 5% a 4°C.
8. Al siguiente día se lavó la membrana con TBS-T y se le adicionó el segundo anticuerpo, anti conejo unido a peroxidasa, a una dilución de 1:5000, también en leche.
9. Finalmente se lavó con TBS-T y se reveló (Ver explicación detallada en Apéndice)

Densitometría y análisis de resultados

Las señales obtenidas en el Western blot fueron analizadas por densitometría empleo Fluor-S y el programa Quianity One. Las señales producidas por el control fueron consideradas como el 100% y las señales obtenidas de las plantas antisentido y con sobre-expresión fueron referidas en porcentaje considerando al control como el 100%. La densitometría se realizó en tres geles, los cuales se hicieron a partir de extractos totales de proteína de 15 plantas independientes de cada línea analizada. Posteriormente se realizó un análisis estadístico para comparar los resultados de las tres poblaciones utilizando la prueba estadística de ANOVA.

Medición del tamaño y número de hojas

Para llevar a cabo estas mediciones, las plantas fueron cultivadas en fotoperíodo de día corto (8 hrs luz) para estimular el crecimiento vegetativo y no produjeran inflorescencia muy pronto. Las mediciones de tamaño de planta y del número de hojas por planta se iniciaron a partir de la tercera semana de siembra, que fue el momento en que las plántulas se transplantaban a tierra. Las mediciones se realizaron semanalmente durante 8 semanas. Para conocer el tamaño de la hoja se consideró el largo de la hoja más vieja. La determinación del número de hojas fue hecha considerando todas las hojas presentes en cada planta al momento de la toma de datos. Se tenían tres lotes de 12 plantas cada uno. El lote control, lote antisentido y lote sobre-expresión. Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el programa Excel y para el análisis estadístico se aplicó un ANOVA.

Resultados

Selección de líneas homocigotas

Las semillas generadas por las plantas que se transformaron por infiltración al vacío se consideraron la generación T_0 . Después de la transformación, se colectaron las semillas de 30 plantas con la construcción en antisentido (AS- T_0) y 15 plantas con la construcción para sobreexpresión (OE- T_0). Las semillas de estas plantas se sembraron en medio MS con kanamicina (50 mg/mL), para realizar la selección y obtener las plantas de la generación T_1 . La resistencia a kanamicina está ligada al gen de interés, por lo tanto, en la generación T_1 todas las plantas fueron heterocigotas y en su fenotipo fueron resistentes a kanamicina. La generación T_2 segregó para estos genes, produciendo una mezcla de genotipos (homocigotas recesivas, heterocigotas y homocigotas dominantes) en cada planta. Así, las plantas de la generación T_2 homocigotas recesivas para kanamicina, y que no tenían el transgen murieron, y solamente sobrevivieron plantas heterocigotas y homocigotas dominantes para kanamicina y para el transgen. Las semillas de cada planta se colectaron independientemente. Al sembrar las semillas de cada una de las plantas de la generación T_2 , aquellas que germinaron al 100% en medio con kanamicina y permanecieron verdes se consideraron plantas homocigotas dominantes, y fueron seleccionadas para constituir la generación T_3 . Las semillas de las plantas T_3 seleccionadas se pusieron a germinar nuevamente para obtener la generación T_4 . Con esta selección se establecieron líneas homocigotas dominantes estables. La genealogía de estas plantas se presenta en la Figura 4.

Durante la selección de las plantas transgénicas en el medio MS con kanamicina se realizó un registro fotográfico de las plantas seleccionadas. En la Figura 5 se observa que las plantas que no presentaban la resistencia a kanamicina eran albinas y morían, las plantas resistentes eran verde pálido y continuaban su desarrollo. Las plantas resistentes posteriormente se transplantaban a tierra y se desarrollaban hasta madurar y producir semilla. Para la colecta de semillas se tuvo mucha precaución de que no se mezclaran las de una planta con otra. Para tener la seguridad de que las semillas colectadas solamente pertenecían a una sola planta, cuyo las plantas maduras en floración, empezaban a producir fruto, se envolvían en papel encerado y la colecta se realizaba invirtiéndolas y depositándolas en una bolsa previamente etiquetada. Posteriormente se limpiaban y las semillas se almacenaban a 4°C.

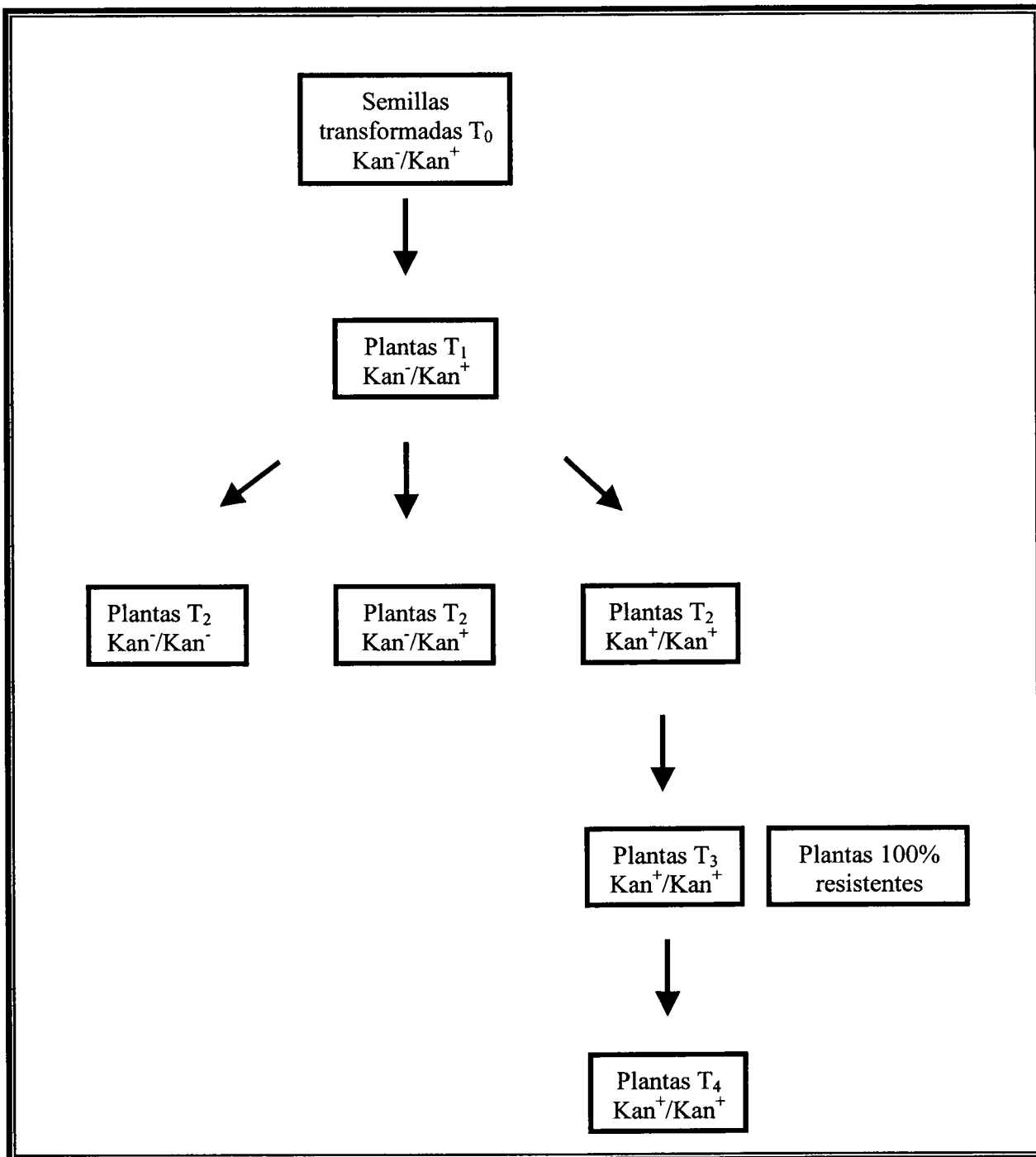


Figura 4. Genealogía. Se colectaron las semillas de las plantas transformadas (generación T₀) las cuales se sembraron en medio MS con kanamicina (50 mg/mL). Las semillas de las plantas resistentes a kanamicina (Kan) fueron a su vez sembradas en medio con el antibiótico para continuar la selección hasta estabilizar los genes y obtener líneas homocigotas.



Figura 5. Selección de las plantas transgénicas. Las semillas se sembraron en medio MS con kanamicina (50 mg/mL) para realizar la selección. Las flechas señalan las plantas sensibles al antibiótico.

Las plantas se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura (22°C) y en fotoperíodo de día largo (16 h luz y 8 h oscuridad), en una cámara de crecimiento (Percival modelo AR-32L) durante el tiempo en que germinaban en el medio MS el cual fue aproximadamente tres semanas. Cuyo fueron transplantadas a macetas, se pasaron al invernadero hasta el momento de colectar las semillas. Se realizó un análisis fenotípico de 20 líneas de la construcción antisentido y 15 líneas con la construcción para sobre-expresión, como control se analizó una línea transformada con el vector SLJ7292 sin inserto, el cual presentaba la resistencia a kanamicina, y plantas silvestres de la variedad Columbia, sin transformar. No se observó ningún cambio dramático en el fenotipo de ninguno de los dos tipos de plantas transformadas (Figuras 6 y 7). Las plantas transgénicas no presentaron ningún fenotipo notable. Se tomaron muestras de tejido foliar para analizar los niveles de proteína y seleccionar aquellas líneas que presentaran alguna alteración en los niveles de la 29RNP, para con ellas realizar un estudio más detallado.

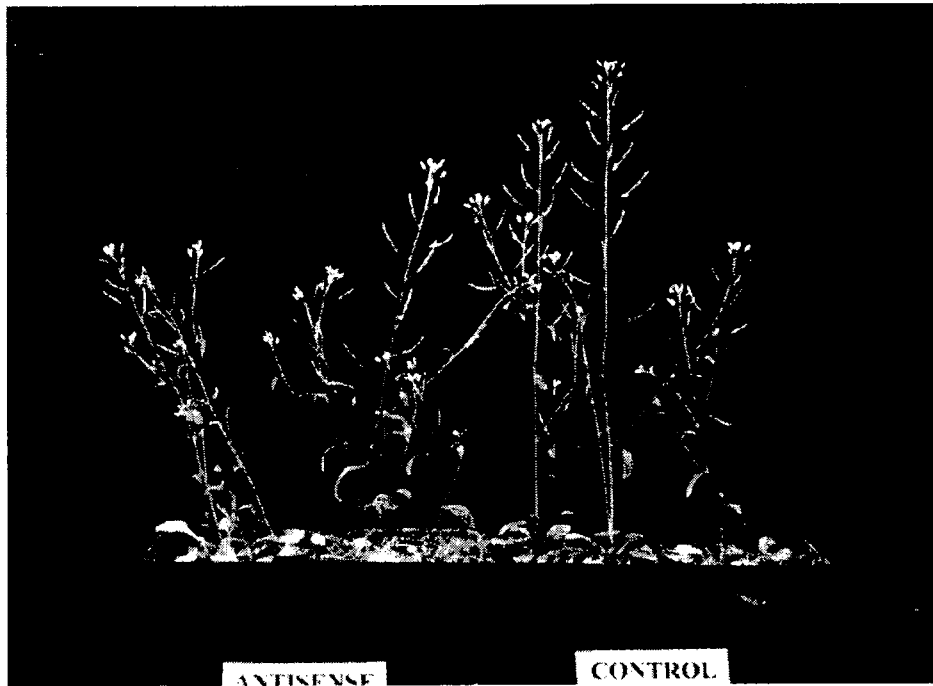


Figura 6. Plantas transgénicas con la construcción en antisentido.

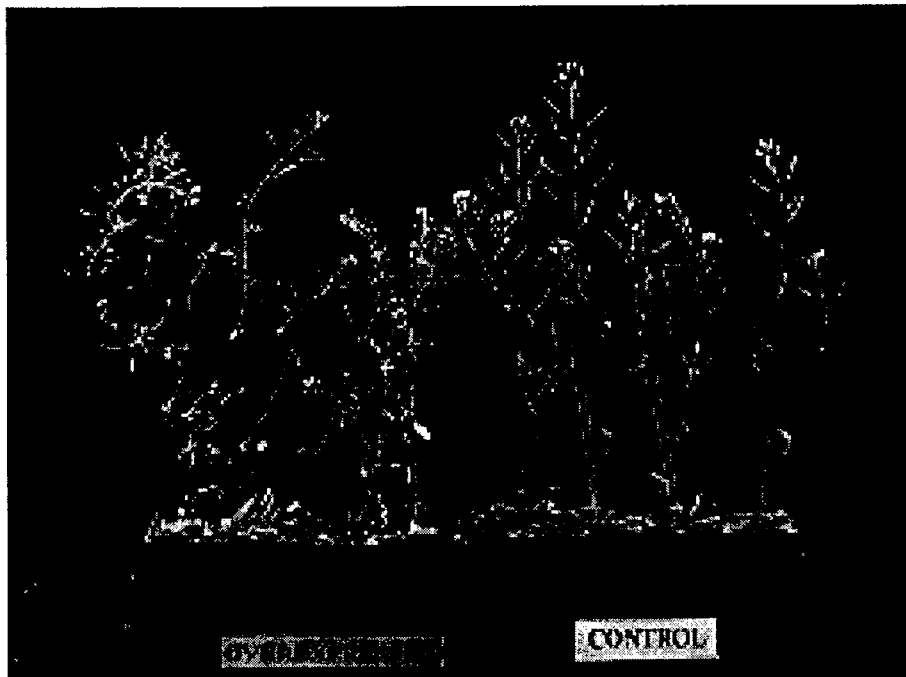


Figura 7. Plantas transgénicas con la construcción para sobre-expresión.

Análisis de los niveles de cp29

Para determinar los niveles de proteína cp29 en las plantas transgénicas de *Arabidopsis*, la cual es la proteína ortóloga de la 24RNP de espinaca, se realizaron “Western blots” en extractos de las plantas transgénicas, empleo anticuerpos generados contra la 24RNP recombinante de espinaca (Robles, 2000). En un trabajo previo en nuestro laboratorio (Zamora, 2004) se demostró que este anticuerpo reconocía a las RNPs que se ha descrito están presentes en el cloroplasto de *Arabidopsis* (Otha *et al.*, 1995).

Primeramente se determinó el fondo reactivo de los anticuerpos realizando un “Western blot” con suero preinmune, en el extracto total de proteínas de las plantas transgénicas de la generación T₄. En todos los carriles se revelaron varias bandas en posición superior al tamaño en el que se esperaba a la cp29 (Figura 8).

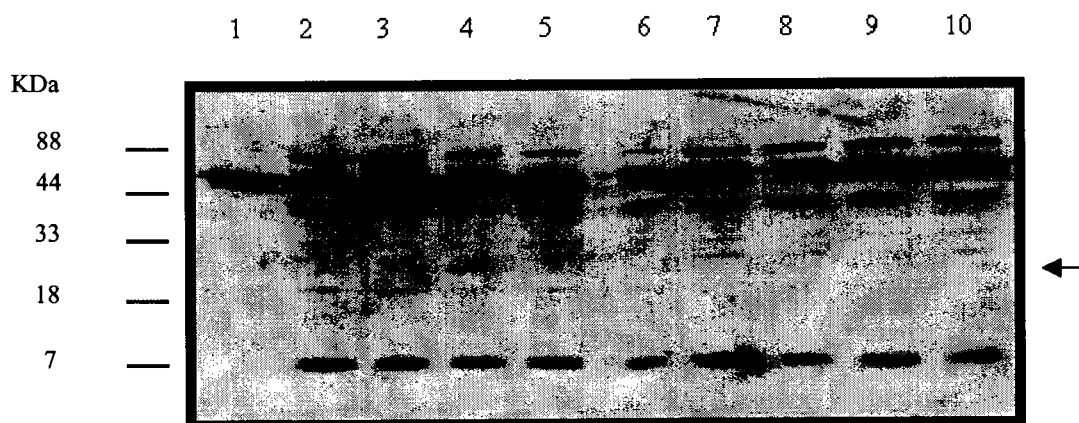


Figura 8. “Western blot” de las plantas transgénicas analizado con suero pre-inmune. Extractos de proteína total de hojas de una planta por línea de *Arabidopsis* (20 µg) (carriles 2 a 10) y de 24RNP recombinante de espinaca (100ng) fueron resueltos en un gel de SDS-PAGE (15%) y transferidos a membranas de PVDF. Las membranas fueron analizadas con suero pre-inmune a una dilución de 1:1,500 en TBS. Carriles 1) 24RNP recombinante, 2) *Arabidopsis* silvestre, 3) Control SLJ7292, 4) AS22, 5) AS23, 6) OE20, 7) Control SLJ7292, 8) AS17, 9) AS20, 10) OE17. AS, antisentidos; OE, sobre-expresión. La flecha señala el sitio donde se esperan las proteínas de interés.

Posteriormente, se realizó un análisis con el suero anti-24RNP, para determinar los niveles de la proteína cp29 en plantas transgénicas de la generación T₄. Como se esperaba, con base en los resultados previos (Zamora, 2003), el anticuerpo reconoció, tres bandas muy cercanas, con tamaños alrededor de 30 kDa (Figura 9). Con base a las secuencias de los genes

que codifican a las tres RNPs de cloroplasto reportadas por Ohta *et al.*, (1995), se calcularon los tamaños esperados de estas proteínas maduras (sin péptido de tránsito). Los tamaños teóricos calculados fueron de 28.3 kDa para la cp29, 27.8 kDa para la cp33 y 26.3 kDa para la cp31. Con base en esta información, la banda de tamaño mayor reconocida por el anti-24RNP correspondería a la cp29, y el doblete inferior corresponderían a la cp33 y la cp31, respectivamente (Fig. 9). Esto permitió determinar como eran afectados los niveles de las otras RNPs en las plantas transformadas. Las otras bandas observadas en estos análisis corresponden a las bandas detectadas por el suero preinmune.

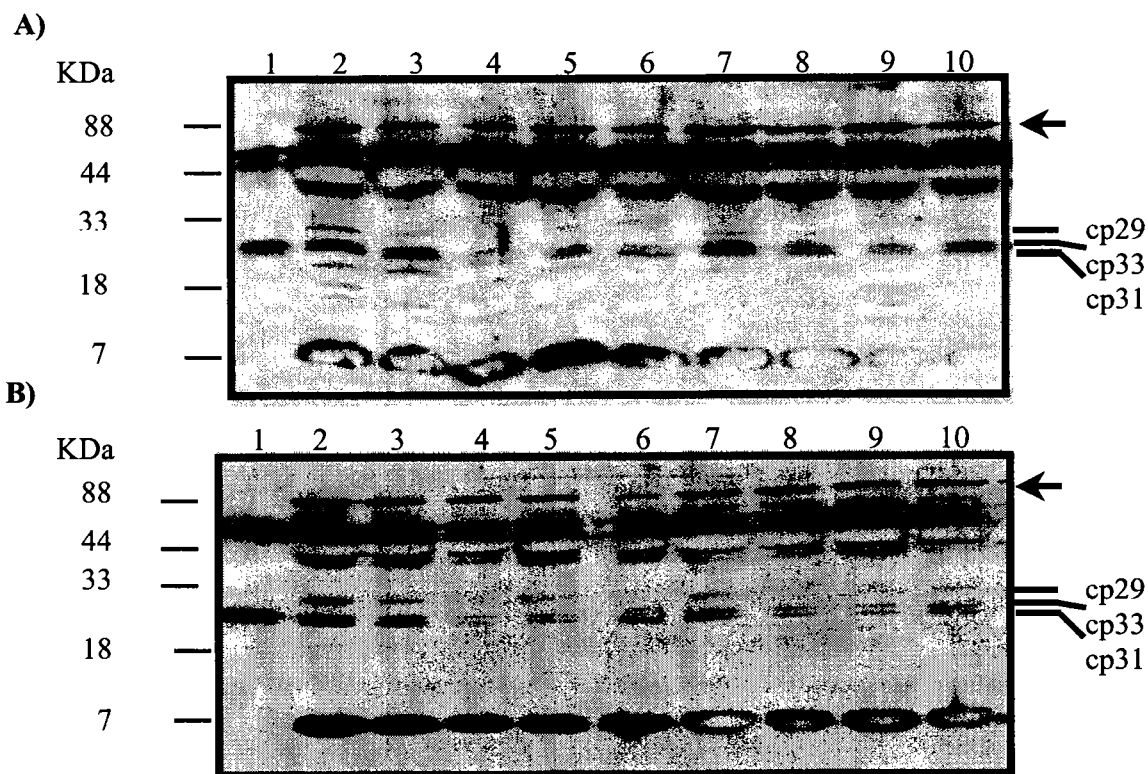


Figura 9. “Western blot” de extractos de las plantas transgénicas analizado con suero anti-24RNP. **A)** Extractos de proteína total de hojas de una planta por línea de *Arabidopsis* (20 µg) y de 24RNP recombinante de espinaca (100 ng) fueron resueltos en un gel de SDS-PAGE (15%) y transferidos a membranas de PVDF. Las membranas fueron analizadas con suero anti-24RNP a una dilución 1:1500 en TBS. Carriles 1) 24RNP recombinante de espinaca, 2) *Arabidopsis* silvestre, 3) Control SLJ7292, 4) AS22, 5) AS23, 6) OE20, 7) Control SLJ7292, 18) AS17, 19) AS20, 10) OE17. AS, plantas transformadas con la construcción antisentido; OE, plantas transformadas con la construcción para sobre-expresión. **B)** Diferentes plantas de las mismas líneas fueron analizadas como se describió en A). La flecha muestra la banda que fue considerada como control de carga.

A partir de realizar el análisis por “Western blot” de 20 líneas con la construcción antisentido se seleccionaron cuatro líneas que presentaban una disminución en los niveles de la cp29: AS17, AS20, AS22 y AS23. Todas las líneas con la construcción en orientación antisentido presentaban una disminución en los niveles de cp29. Por otra parte se seleccionaron dos líneas de la construcción para sobre-expresión: OE17 y OE20 (Figura 9), a partir de 18 líneas, contrario a lo que se esperaba, estas líneas presentaban una disminución en los niveles de la cp29. En las líneas para sobre-expresión no se logró encontrar ninguna que presentara un aumento en los niveles de la cp29, todas presentaban niveles normales o disminuidos. Se realizó otro “Western blot” con otras plantas de las mismas líneas transgénicas con el fin de determinar si la cantidad de proteína disminuía de manera semejante en todas las plantas de la misma línea. Los resultados fueron semejantes a los del primer análisis, en todas las líneas aún en las de sobre-expresión, se observó una disminución de los niveles de proteína cp29 (Figura 9B). Las otras pequeñas RNPs, la cp31 y la cp33 también mostraron niveles disminuidos en ambos tipos de plantas.

Para cuantificar las variaciones en los niveles de las proteínas de interés se realizó una densitometría. En el análisis se tomó una banda de proteína presente en todos los carriles como un control interno de carga (flecha, en la Fig. 9) para realizar la normalización de los resultados de las bandas correspondientes a las proteínas cp29, cp31 y cp33. Se expresaron los resultados como porcentaje con relación al control. De manera general, se observó una disminución muy marcada en los niveles de las tres proteínas, en las plantas seleccionadas. La disminución más notable, se observó en las tres bandas de la línea AS22, pues contenían únicamente 16, 22 y 17 %, de cp29, cp31 y cp33, respectivamente (Fig 10). La disminución en las cantidades de estas proteínas fue muy semejante entre las tres bandas (Fig. 10), a excepción de la línea OE20 en donde el nivel de la cp29 es menor que el de las otras proteínas (cp31 y cp33). Estos resultados indican que el efecto de las construcciones no fue solamente sobre la cp29, sino también sobre las cp31 y cp33, las cuales mostraron disminuciones muy semejantes a la cp29.

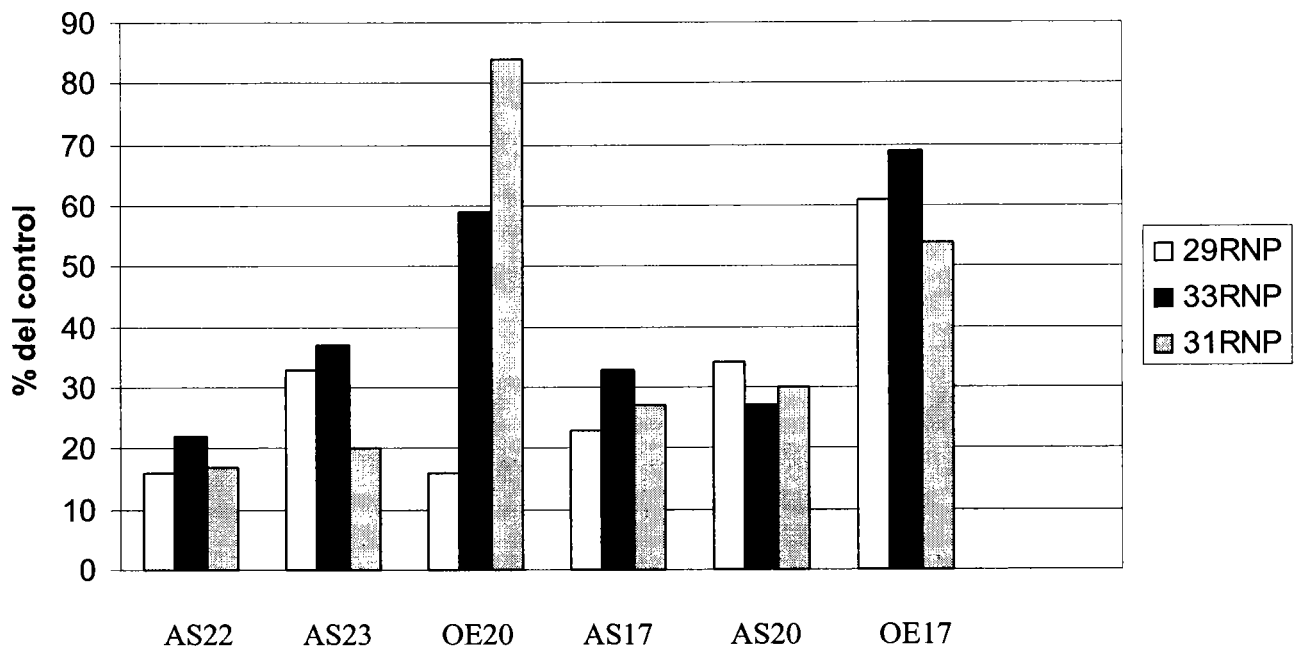


Figura 10. Densitometría de las byas reveladas con el anticuerpo anti-24RNP en plantas transgénicas. Cada una de las bandas del control (cp29, cp31, cp33) SLJ7292 representan el 100%. Los datos fueron normalizados por carga de proteína en el carril, midiendo la intensidad de una banda control, presente en todos los carriles. Número de geles analizados, 3.

Análisis fenotípico de las plantas transformadas

Aunque se observó una disminución significativa en los niveles de las cp29, cp31 y cp33 en las plantas transformadas tanto con la construcción en orientación antisentido como para sobre-expresión, estas disminuciones no estuvieron acompañadas de un cambio notable en el fenotipo de las plantas transformadas. Por lo tanto, se decidió realizar un análisis fenotípico más detallado. Para esto se midió el tamaño de la roseta y el número de hojas en tres lotes de 15 plantas (control, SLJ7292; antisentido, AS17; y sobre-expresada, OE17), cultivadas en las mismas condiciones de fotoperíodo (día corto, 8 h luz y 16 h oscuridad), durante ocho semanas. La medición se inició a partir de la tercera semana de siembra ya que fue el momento en el que las plántulas fueron transplantadas a tierra. A partir de este momento la medición se realizó cada semana durante seis semanas para determinar el tamaño de la roseta y cinco semanas para determinar el número de hojas.

En la primera semana después del transplante (tercera semana), no hubo diferencias en el tamaño de la roseta entre las plantas control y las transgénicas. Sin embargo, a medida que transcurrieron las semanas, las plantas control aumentaron el tamaño de la roseta en mayor proporción que las plantas antisentido y las de sobre-expresión. Estas diferencias se fueron incrementando a través de las semanas en las plantas antisentido, llegando a ser un poco más de 1 cm más pequeñas (25% menos) que las plantas control, a las siete semanas. Mientras que en las plantas de la línea OE17, las diferencias fueron menores a partir de la sexta semana (Figura 11). El análisis estadístico ANOVA no mostró diferencias significativas entre el control y las plantas transgénicas con una $p < 0.05$.

En cuanto al número de hojas los datos indicaron que también se presentaba una menor cantidad en las plantas con la construcción de sobre-expresión. Aunque durante las primeras semanas no existió ninguna diferencia, éstas se presentaron a partir de la quinta semana (Figura 12). Estadísticamente, a partir de esta semana no existen diferencias significativas entre el control y las plantas con la construcción de sobre-expresión y las antisentido, empleando la prueba estadística ANOVA ($p < 0.05$).

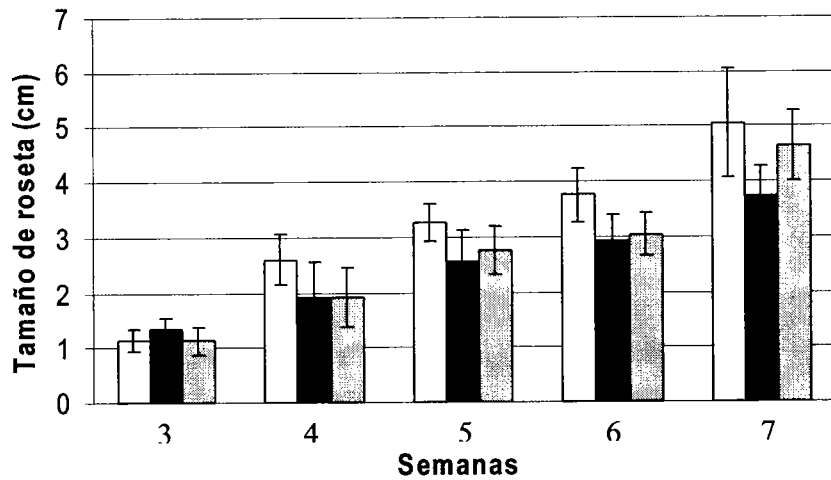


Figura 11. Medición del tamaño de la roseta de las plantas transgénicas. Se midió el diámetro de 12 plantas de cada una de las líneas control (blanco), OE17 (barras negras) y AS17 (barras grises).

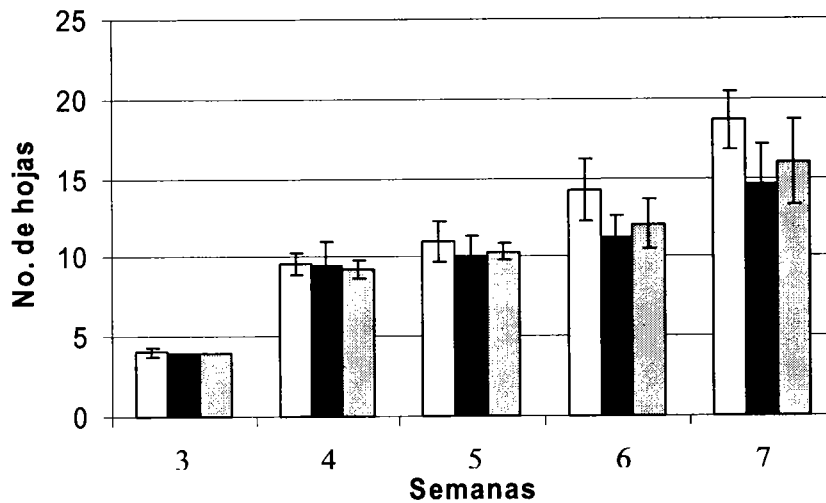


Figura 12. Número de hojas de las plantas transgénicas. Cada dato es el promedio de 12 repeticiones. Existe una menor cantidad de hojas en las líneas OE (barras negras) y AS (barras grises) en comparación con el control (barras blancas).

Discusión

En los cloroplastos de espinaca, cebada y tabaco se ha observado que durante el desarrollo y la diferenciación inducida por luz, la frecuencia relativa del inicio de la transcripción de algunos genes permanece constante, pero existen diferencias significativas en la abundancia de sus RNAs (Deng and Gruissem, 1987; Mullet and Klein, 1987; Deng *et al.*, 1987; Klein and Mullet, 1990; Gruissem and Schuster, 1993). Estos resultados indican que la regulación post-transcripcional, ya sea al nivel de procesamiento o de estabilidad de los mRNAs, juega un papel muy importante en el control de la expresión genética de los cloroplastos.

La estabilidad de los mensajes del cloroplasto depende de que sean correctamente procesados. El procesamiento involucra: el splicing de intrones, corte endonucleolítico en regiones intercistricas, modificaciones del extremo 5' y 3' no traducible, y edición del RNA (Monde *et al.*, 2000). Estos procesos han sido reconocidos como importantes reguladores de la expresión genética (Siomi *et al.*, 1997). El estudio de los eventos de procesamiento es sólo el inicio del conocimiento, pero una detallada explicación del procesamiento del RNA plastídico *in vivo*, todavía no existe.

En el procesamiento postranscripcional participan diferentes componentes involucrados en los distintos procesos. Por ejemplo actividades endo y exo-nucleolíticas para el procesamiento de los extremos 5', 3' y el "splicing" y actividades modificadoras de bases para la edición de mRNAs cloroplásticos. Las proteínas de unión a RNA (RNP) son participantes importantes en estos procesos. En cloroplastos de distintas especies se han reportado la presencia de varias RNPs, en tabaco la cp28, cp29A, cp29B, cp31 y cp33 (Li y Sugiura 1990; Li *et al.*, 1993); en chícharo, la 33RNP (Reddy *et al.*, 2001); en cebada, la cp31AHv y la cp31BHv (Churin *et al.*, 1999); en espinaca, la 24RNP, 28RNP y 33RNP (Hsu-Ching *et al.*, 1991); y en *Arabidopsis thaliana*, la cp28RNP, cp28bRNP, cp29RNP, cp29bRNP, cp31RNP, cp31bRNP, cp33RNP y cp33bRNP (Ohta *et al.*, 1995; Lorkovic y Barta, 2002). Todas estas proteínas son codificadas en el genoma nuclear, sintetizadas en el citoplasma y dirigidas al cloroplasto por la presencia de un péptido de tránsito en el extremo amino terminal. Con el conocimiento de las secuencias completas de los genomas de varias

plantas se irán conociendo otras proteínas que podrán clasificarse dentro de este grupo, como ha sido el caso en *Arabidopsis thaliana* (Barta, 2002).

La función de la mayoría de estas proteínas no ha sido determinada. La proteína 28RNP de espinaca, que fue la primera en ser estudiada, tiene un papel determinante en la definición del sitio de procesamiento correcto en el extremo 3'UTR de mRNAs cloroplásticos (*psbA*, *rbcL* y *petD*) de espinaca (Schuster y Gruissem 1991). Las proteínas de tabaco se han encontrado en el estroma de los cloroplastos, asociadas a los mensajeros, lo cual sugiere que están participando en la determinación de su estabilidad (Nakamura *et al.*, 2001). Estas mismas proteínas se encontraron unidas a los pre-tRNAs y a sitios de edición en el mRNA de *psbL* (Nakamura *et al.*, 1999). Estos resultados indican que estas proteínas están implicadas en diferentes mecanismos de procesamiento y maduración de los mRNAs de cloroplastos.

En nuestro laboratorio se ha estudiado la función de la 24RNP de espinaca en el procesamiento de los 3'UTRs de mensajeros cloroplásticos. Mediante ensayos de procesamiento *in vitro* empleando extractos purificados de cloroplastos intactos se ha encontrado que la 24RNP participa en proteger a los 3'UTRs contra la degradación (Loza-Tavera *et al.*, en preparación). En este trabajo se abordó la estrategia de la construcción de plantas transgénicas para profundizar en el conocimiento de la actividad de esta proteína. Dado que *A. thaliana* es una planta que puede ser transformada genéticamente con relativa facilidad, y sabiendo que la cp29 de *Arabidopsis thaliana* presenta una alta identidad (86%) con la proteína 24RNP de espinaca, se generaron plantas transgénicas de esta especie transformadas con el gen de la cp29, en orientación sentido y antisentido. Con esta estrategia se esperaba poder determinar si la cp29 era una proteína esencial para el funcionamiento del cloroplasto, tal que al reducir o aumentar su expresión, la planta presentara algún efecto observable durante su desarrollo.

La genealogía de las plantas transformadas, se realizó a través del seguimiento del gen de la neomicina fosfotransferasa (NPTII), el cual proporciona resistencia a kanamicina y se encuentra en el vector de clonación. Asumiendo que este gen y el de la cp29 permanecen unidos durante la segregación, dada su cercanía, y aunado a que la segregación obtenida en todas las transformantes fue de tres plantas resistentes por una sensible, en la generación T₂ se puede deducir que en cada evento de transformación hubo una sola inserción es decir, que solamente existe una copia del transgen por transformación.

Tanto las plantas transformadas con la construcción en antisentido como con la construcción para sobre-expresión presentaron bajos niveles de cp29

Los niveles de cp29 fueron bajos en todas las plantas transgénicas, tanto con la construcción en antisentido como con la construcción para sobre-expresión (Fig. 10). En las plantas con la construcción en antisentido la disminución en los niveles de proteína fue en todos los casos mayor de 65% con disminuciones de hasta 85%, mientras que en las plantas con la construcción para sobre-expresión se observaron casos con una reducción discreta (38%) y otros con una reducción del 84%, en comparación con las plantas control.

La tecnología de antisentidos es una herramienta para controlar la expresión de genes. Desde las primeras descripciones de la inhibición de la expresión genética por antisentido en 1978, esta tecnología ha tenido un desarrollo y aplicación exponencial. Tradicionalmente un antisentido es una cadena de DNA que selectivamente inhibe la expresión de un gen blanco por apareamiento de las bases en regiones complementarias o sitios blanco sobre el gen de interés (Kim *et al.*, 2003). El antisentido puede afectar la expresión del gen blanco a todos los niveles: transcripción, procesamiento y transporte del RNA, estabilidad y traducción. Estos efectos son debidos a la formación de una doble cadena de RNA que conduce a diferentes caminos de degradación, uno vía el reclutamiento de RNAsas y otro mediante la detención, mediada por el impedimento estérico, de la lectura del RNA por los ribosomas (Jorgensen *et al.*, 1999).

En las plantas con la construcción para sobre-expresión de la cp29, a diferencia de lo que se esperaba, no se presentó un aumento en los niveles de proteína, sino al contrario, se presentó una disminución, de hasta 84% (OE20). Es posible que haya ocurrido un fenómeno de co-supresión o silenciamiento post-transcripcional (PTGS, "post-transcriptional gene silencing"), que ha sido descrito para otros genes (Matzke y Matzke 1998; Vaucheret *et al.* 2001; Susi *et al.*, 2004).

El mecanismo de silenciamiento o co-supresión fue primeramente descrito en plantas transgénicas de petunia, las cuales se transformaron con un gen implicado en la biosíntesis de pigmentos. Contrario a lo que se esperaba las plantas transformadas no aumentaban su pigmento, sus flores eran despigmentadas (Napoli *et al.*, 1990; van der Krol *et al.*, 1990). El mecanismo de PTGS se presenta en todos los organismos, desde plantas y hongos, hasta

mamíferos, y al parecer es por un mecanismo que ha sido muy conservado (Susi *et al.*, 2004). La co-supresión o PTGS se ha explicado con base a que la cantidad de copias de un mensajero está estrechamente regulada, por lo cual, al presentarse una sobre-expresión en la célula normal, ciertos mecanismos ejercen control a nivel transcripcional, produciendo el silenciamiento (Kumpatla *et al.*, 1998, Ingelbrecht *et al.*, 1994; Fire, 1999, Vaucheret *et al.*, 2001). Se ha sugerido que cuando se presenta un incremento en los niveles de RNA tres veces mayores que los niveles normales se activa la maquinaria de silenciamiento (Flavell, 1994). En muchos casos de silenciamiento de genes se ha encontrado que múltiples copias del transgen fueron integradas en el genoma. Sin embargo, una sola copia de un transgen altamente expresado por un promotor fuerte puede causar silenciamiento (Han *et al.*, 2004).

Los mecanismos implicados en el PTGS, todavía no están muy claros. Los pequeños RNAs de interferencia, RNAs aberrantes y RNA de doble cadena, son los candidatos sugeridos que prenden las señales de silenciamiento (Yu y Kumar 2003). La generación de dobles cadenas ectópicas es uno de los mecanismos propuestos como responsables del silenciamiento de secuencias semejantes. La formación de la doble cadena conlleva a la metilación y generación de transcritos truncados, los cuales se han reportado en el hongo *Ascobolus* (Barry *et al.*, 1993).

La relación entre PTGS y la disminución de la expresión por un antisentido todavía no está muy clara. Alelos sentido y antisentido del transgen que codifica a la chalcona sintasa (*Chs*) implicado en la pigmentación de las flores en petunia genera diferencias marcadas en los patrones de expresión (Que *et al.*, 1997). El PTGS involucra la degradación del RNA blanco en el citoplasma, mientras que la expresión de un RNA antisentido reduce los niveles del RNA sentido por mecanismos nucleares relacionados con la estabilidad. El paralelismo entre estos dos mecanismos, es que ambos pueden conducir a la degradación del RNA, la señal que los induce puede ser muy semejante, pero todavía no está muy claro el mecanismo (Jorgensen *et al.*, 1999).

Un mecanismo de silenciamiento recientemente descrito son los RNA de interferencia. Estas moléculas se generan a partir de RNAs de doble cadena que son procesados por una enzima llamada DICER la cual genera fragmentos de 20 a 25 nucleótidos que se unen al RNA blanco generando la degradación del transgen y con ello el silenciamiento (Agrawal *et al.*, 2003; Kerschen *et al.*, 2004).

Por otro lado, se ha reportado en *Arabidopsis thaliana* (Elmayan *et al.*, 1998) y tomate (Han *et al.*, 2004) que el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor es un promotor fuerte el cual genera altos niveles de transcrito del gen que está regulando, lo cual puede ser causa de silenciamiento. En nuestro trabajo empleamos este promotor para dirigir la transcripción tanto del gen en orientación correcta como en antisentido. Esto podría haber contribuido al silenciamiento observado en las plantas con la construcción para sobre-expresión.

En contraste con los resultados de este trabajo, cuando se sobre-expresa la cp31 en plantas de *Arabidopsis* se observaron niveles de 10 a 100 veces mayores que el control (Phayre, 2000). Estos resultados sugieren que la regulación de los niveles de cp29 podrían ser perjudiciales para las plantas, mientras que incrementos de la cp31 no lo son. Esto implicaría que el sistema biológico tiene mecanismos para no permitir que la cp29 incremente sus niveles, mientras que la cp31 puede ser incrementada sin restricciones del sistema.

Los niveles de las otras RNPs cloroplásticas de *A. thaliana* (cp31 y cp33) también disminuyeron en las plantas transgénicas

Previamente se había demostrado que el anticuerpo anti-24RNP de espinaca reconocía a tres RNPs cloroplásticas de *Arabidopsis thaliana* (Zamora, 2004). En este trabajo, las tres RNPs se detectaron claramente en las plantas control. A pesar de que las plantas transgénicas fueron diseñadas para afectar la expresión de la cp29, el análisis densitométrico de las bandas correspondientes a la cp31 y cp33 mostró que los niveles de estas proteínas también resultaron fuertemente disminuidos, hasta en 82% y 78% para la cp31 y cp33 respectivamente en la línea AS22 (Fig. 10). Este efecto en el cual la disminución de la expresión de un gen conlleva a la disminución de la expresión de otros genes ya ha sido descrito en otros organismos transgénicos. En esos casos, el fenómeno se ha presentado cuando existen genes que presentan una similitud arriba del 70% con respecto al gen blanco (Ingelbrecht *et al.*, 1994; Dehio *et al.*, 1994). Sin embargo, se ha reportado que el silenciamiento de algunos genes puede ocurrir al emplear secuencias homólogas tan cortas como 23 nt, es decir, aproximadamente el 10% del tamaño del gen blanco (Thomas *et al.*, 2001). Aunque al parecer los requerimientos para el proceso de silenciamiento son especie-específicos, en términos de tamaño de la secuencia y el grado de identidad, generalmente se requiere de una identidad mayor al 75% para inducir el

silenciamiento en genes semejantes (Sijen *et al.*, 1996). En el caso de este trabajo, los genes *athcp31* y *athcp33* que codifican a la cp31 y cp33 respectivamente tienen una identidad menor del 40%, con el gen *athcp29*.

Este grupo de genes presenta regiones que son conservadas, por ejemplo las regiones de unión a RNA, por lo cual la disminución en los niveles de la cp31 y cp33 se puede deber a que se están formando zonas de doble cadena en las regiones conservadas, que pueden ser degradadas por una RNAsa que reconoce doble cadena o las regiones que no hibridan pueden ser eliminadas por RNAsas que reconocen cadena sencilla. Por otro lado, estas regiones de doble cadena pueden causar que estos mensajeros no puedan ser leídos por los ribosomas.

Por otro lado, los fragmentos generados por el corte de la molécula híbrida del gen *athcp29* asociado al RNA antisentido en las plantas transgénicas pueden llegar a interactuar con regiones conservadas en los mensajeros de cp31 y cp33, ocasionando lo que se mencionó anteriormente.

La co-supresión observada en estas plantas no es un fenómeno inusual sino al contrario, es un mecanismo muy frecuente que se presenta en las plantas transgénicas. En este caso estos resultados podrían deberse a que la sobre-expresión de la cp29 induce mecanismos de silenciamiento, como los anteriormente mencionados, lo cual puede generar la aparición de RNAs de interferencia o RNAs antisentido, que interactúan con los genes que codifican las cp31 y cp33 a través de las regiones conservadas, afectando los niveles de esas proteínas.

Sin embargo, también existe la posibilidad de que la disminución en los niveles de la cp31 y la cp33 sea debida a un mecanismo de control postraducciona. En varios complejos que funcionan en el cloroplasto, como RUBISCO (Roy *et al.*, 1982; Roy *et al.*, 1988) y PSII (Baena-González y Aro, 2002), en los cuales existe una estequiometría precisa entre las distintas subunidades que los componen, la cantidad de las subunidades no es regulada durante su síntesis, sino que la regulación ocurre cuando los complejos son ensamblados y las subunidades remanentes son degradadas (Choquet *et al.*, 2001). En el caso de las RNPs de cloroplasto, estas proteínas se han identificado en un complejo de alto peso molecular con actividad de procesamiento de RNA (Hayes *et al.*, 1996). Aunque no se conoce la estequiometría de estas subunidades en el complejo, podría existir la posibilidad de que los bajos niveles de cp31 y cp33 fueran una respuesta a los bajos niveles de cp29 generados por el antisentido o la co-supresión.

La disminución en los niveles de las RNPs cloroplásticas está asociada con una disminución en el tamaño de las plantas transgénicas

El análisis fenotípico de todas las generaciones no mostró ningún fenotipo aberrante con respecto a las plantas control (Fig. 6 y 7). Sin embargo, en ambos tipos de plantas transgénicas el tamaño de la roseta era menor (Fig. 12). Estos resultados indican que la disminución en los niveles de las RNPs de cloroplasto afecta el desarrollo de las plantas. El número de hojas estadísticamente no presentaron diferencias (Fig. 13).

En un trabajo en el que se produjeron plantas transgénicas de *Arabidopsis* con un fragmento del gen de la cp31 en antisentido, se obtuvieron plantas con niveles reducidos de esa proteína sin afectar la estructura del cloroplasto, ni los niveles de clorofilas, ni la expresión de algunos de los genes que se expresan en cloroplasto, no mostrando ningún cambio fenotípico notable (Phayre, 2000). Sin embargo, aumentos en el contenido de esta proteína por la presencia de una construcción para sobre-expresión produjeron fenotipos en los que el tamaño de las plantas era ligeramente menor que las silvestres y la etapa vegetativa se prologaba mostrando un retraso de hasta 38 días en la floración, cuando las plantas crecían en día corto, pero no cuando crecían en día largo (Phayre, 2000). Estos resultados y los encontrados en este trabajo, permiten sugerir que la actividad de estas proteínas está relacionada con procesos de desarrollo vegetativo de las plantas, los cuales se vieron afectados por la disminución de la cp29 y la sobre-expresión de la cp31.

Se ha sugerido que las proteínas 28RNP y 24RNP de cloroplasto de espinaca están involucradas en el mismo proceso, pero con una diferencia temporal en su expresión. Experimentos *in vitro* han demostrado que si se inmunosubstrae ya sea la 28RNP o la 24RNP, el procesamiento de los mensajeros no se ve afectado, pero si se eliminan las dos proteínas el mensajero es degradado (Loza-Tavera *et al.*, 2004 en preparación). En las plantas de *Arabidopsis*, la disminución en los niveles de las proteínas cp29 y cp31 es muy drástica, pero ninguna de las dos proteínas desaparece por completo, por lo que quizá, a pesar de que la cantidad existente es poca, es suficiente para que la función se lleva a cabo adecuadamente aunque tal vez no a su máxima capacidad, por lo que se observa un retraso en el crecimiento.

Se ha descrito que las RNPs de cloroplasto de tabaco, además de participar en el procesamiento de los 3'UTRs de los mensajeros cloroplásticos, también están implicadas en

algunos otros procesos, como estabilidad y "splicing" (Li y Sugiura, 1990; Sugiura, 2001; Miyamoto *et al.*, 2002). Por lo cual se podría especular que al existir una disminución en los niveles de proteínas de las RNPs de *Arabidopsis* (cp29, cp31 y cp33), también se podría estar presentando un efecto secundario, afectando otros niveles en el procesamiento de los mensajeros de cloroplasto, aunque, esto sería necesario comprobarlo. En la secuencia del genoma de *Arabidopsis* se han identificado ocho genes que codifican posibles RNPs de cloroplasto (Lorkovic y Barta, 2002). Esto complica aún más el panorama, al tratar de dilucidar los mecanismos por los cuales este grupo de proteínas funciona.

Conclusiones

1. Fue posible producir plantas transformadas de *Arabidopsis thaliana* con una construcción en antisentido del gen *athcp29* que codifica a la proteína de unión a RNA cp29 y plantas transformadas con una construcción para sobre-expresión.
2. Ambos tipos de plantas transgénicas mostraron bajos niveles de la cp29. Esto indica que en las plantas con la construcción para sobre-expresión se presentó un fenómeno de co-supresión o silenciamiento génico.
3. Se identificaron líneas con niveles de cp29 reducidos hasta en 85%.
4. En las plantas con niveles reducidos de cp29 también disminuyeron los niveles de otras RNPs cloroplásticas (cp31 y cp33).
5. La disminución en los niveles de estas proteínas afectó el desarrollo de *Arabidopsis thaliana* produciendo plantas que tenían un menor tamaño de la roseta.

Perspectivas

1. Ampliar el análisis fenotípico a mayor número de líneas y llevarlo a cabo en condiciones de cultivo variadas. Quizá en condiciones de estrés, los bajos niveles de RNPs cloroplásticas si sean un punto limitante para el buen funcionamiento del cloroplasto.
2. Realizar estudios de procesamiento *in vitro* y análisis por entrecruzamiento con UV para determinar si el procesamiento está alterado.
3. Analizar los patrones de hibridación que presenten distintos genes cloroplásticos para determinar si algunos de ellos se encuentran alterados.

Referencias

- Agrawal N, Dasaradhi P, Mohammed A, Malhotra P, Bhatnagar R, Mukherjee S. 2003. RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Micro Mol Biol Rev.* 67: 657-685.
- Auchincloss AH, Zerges W, Perron JK, Girard-Bascou J, Rochaix J. 2002. Characterization of Tbc2, a nucleus-encoded factor specifically required for translation of the chloroplast *psbC* mRNA in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Cell Biol.* 157: 953-962.
- Baena E, Aro E. 2002. Biogenesis, assembly and turnover of photosystem II units. *Phyl Trans R Soc Lond B.* 357: 1451-1460.
- Baginsky S, Shteiman-Kotler A, Liveanu V, Yehudai-S, Bellaoui M, Settlage R, Shabanowitz J, Hunt D, Schuster G, Gruissem W. 2001. Chloroplast PNPase exists as a homomultimer enzyme complex that is distinct from the *Escherichia coli* degradosome. *RNA.* 7: 1646-1475.
- Baginsky S, Gruissem W. 2002. Endonucleolytic activation directs dark-induced chloroplast mRNA degradation. *Nucleic Acids Res.* 30: 4527-33.
- Barkan A, Goldschmidt-Clermont M. 2000. Participation of nuclear genes in chloroplast gene expression. *Biochimie* 82: 559-72
- Barry C, Faugeron G, Rossignol J. 1993. Methylation induced premeiotically in *Ascobolus* coextension with DNA repeat lethals and effect on transcription elongation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90: 4557-4561.
- Bar Zvi D, Shagan T, Schindler U, Cashmore A. 1992. RNP-T, a ribonucleoprotein from *Arabidopsis thaliana*, contains two RNP-80 motifs and a novel acidic repeat arranged in a α -helix conformation. *Plant Mol Biol.* 20: 833-838.
- Bauer J, Hiltbrunner A, Kessler F. 2001. Molecular biology of chloroplast biogenesis: gene expression, protein import y intraorganellar sorting. *Cell. Mol. Life Sci.* 58: 420-433.
- Bock R, Koop H. 1997. Extrplastidic site-specific factors mediate RNA editing in chloroplasts. *EMBO J.* 16: 3282-3288.
- Bock R. 2000. Sense from nonsense: How the genetic information of chloroplasts is altered by RNA-editing. *Biochimie* 82: 549-557.
- Bollenbach T, Tatman D, Stern D. 2003. CSP41a, is multifunctional RNA-binding protein, initiates mRNA turnover in tobacco chloroplasts. *Plant J.* 36: 842-852.

- Boudreau E, Nickelsen J, Lemaire S, Ossenbühl F, Rochaix J. 2000. The *Nac2* gene of *Chlamydomonas reinhardtii* encodes a chloroplast TPR protein involved in *psbD* mRNA stability processing y/or translation . EMBO J. 19: 3366-3376.
- Breiteneder H, Michalowski C, Bohnert H. 1994. Enviromental stress-mediated differential 3' end formation of chloroplast RNA-binding protein transcripts. Plant Mol. Biol. 26: 833-849.
- Bruick R, Mayfield S. 1999. Light-activated translation of chloroplast mRNAs. TRENDS SCI PLANT 4: 190-195.
- Bunse A, Nickelsen J, Kück U. 2001. Intron-specific RNA binding proteins in the chloroplast of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Biochim. Biophys. Acta. 1519: 46-54.
- Carpousis A, Vanzo N, Raynal L. 1999. mRNA degradation a tale of poly(A) and multiprotein machines. TRENDS GENET 15: 24-28.
- Chateigner-Boutin A, anson M. 2003. Development co-variation of RNA editing extent of plastid editing sites exhibiting similar cis-elements. Nuc. Ac. Res. 31: 2586-2594.
- Cheng S, Cline K, DeLisle A. 1994. An *Arabidopsis* chloroplast RNA-binding protein gene encodes multiple mRNAs with different 5' ends. Plant Physiol. 106: 303-311.
- Choquet Y, Wostrikoff K, Rimbault B, Zito F, Girard J, Drapier D, Wollman F. 2001. Assembly-controlled regulation of chloroplast gene translation. Biochem Soc Trans. 29: 421-426.
- Churin Y, Hess W, Börner T. 1999. Cloning y characterization of three cDNAs encoding chloroplast RNA-binding proteins from barley (*Hordeum vulgare* L): differential regulation of expression by light and plastid development. Curr. Genet. 36: 173-81
- Cook W, Walker J. 1992. Identification of a maize nucleic acid-binding protein (NBP) belonging to a family of nuclear-encoded chloroplast proteins. Nuc. Ac. Res. 20: 359-364.
- Cogoni C, Macino G. 1997. Conservation of transgene-induced post-transcriptional gene silencing in plants and fungi. TRENDS SCI PLANT 2: 438-443.
- Danon A. 1997. Translational regulation in the chloroplast. Plant Physiol. 115: 1293-1298.
- Del Campo EM, Sabater B, Martin M. 2002. Post-transcriptional control of chloroplast gene expression. Accumulation of stable *psaC* mRNA is due to downstream RNA cleavage in the *ndhD* gene. J. Biol. Chem. 277:36457-64

- DeLisle A. 1993. RNA-binding protein from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 102: 313-314.
- Deng W, Gruissem W. 1987. Control of plastid gene expression during development: the limited role of transcriptional regulation. *Cell.* 49: 379-387.
- Depicker A, Stachel S, Dhaese P, Zambryski P, Goodman H. 1982. Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. *J. Mol. App. Genet.* 1: 561-573.
- Doebley J, Lukens L. 1998. Transcriptional regulators and the evolution of plants form. *Plant Cell* 10: 1075-1082.
- Elmayan T, Belzergue S, Béon F, Bourdon V, Daubrement J, Guénet Y, Mourrain P, Palauqui J, Vernhettes S, Vialle T, Wostrikoff K, Vaucheret H. 1998. *Arabidopsis* mutants impaired in cosuppression. *Plant Cell.* 10: 1747-1757.
- Fire A. 1999. RNA-triggered gene silencing. *TIG.* 15: 358-363
- Flavell R. 1994. Inactivation of gene expression in plants as a consequence of specific sequence duplication. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91: 3490-3496.
- Gallie D, Bailey-Serres J. 1997. Eyes off transcription! The wonderful world of post-transcriptional regulation. *Plant Cell.* 9: 667-673.
- Giordano E, Peluso I, Senger S, Furia M. 1999. *minifly*, a *Drosophila* gene requires for ribosome biogenesis. *J Cell Biol.* 144: 1123-1133.
- Grierson D, Fray R, Hamilton A, Smith C, Watson C. 1991. Does co-suppression of sense genes in transgenic plants involve antisense RNA? *Trends Biotechnol.* 9: 122-123.
- Gruissem W, Barkan A, Deng XW, Stern D. 1988. Transcriptional y post-transcriptional control of plastid mRNA levels in higher plants. *TRENDS GENET* 4: 258-263.
- Gruissem W, Tonkyn J. 1993. Control mechanisms of plastid gene expression. *Crit Rev Plant Sci.* 12: 329-365.
- Guiltinan M, Niu X. 1996. cDNA encoding a wheat (*Triticum aestivum* cv. *Chinese Spring*) glycine-rich RNA-binding protein. *Plant Mol. Biol.* 30: 1301-1306.
- Han Y, Griffiths A, Li H, Grierson D. 2004. The effect of endogenous mRNA levels on co-suppression in tomato. *FEBS Lett.* 563: 123-128.
- 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.

- Hayes R, Kudla J, Gruissem W. 1999. Degrading chloroplast mRNA: the role of polyadenylation. *TIBS*. 24: 199-202.
- Hélène C, Toulmé J. 1990. Specific regulation of gene expression by antisense, sense and antigene nucleic acids. *Biochem. Biophys. Acta* 1049: 99-125.
- Hirose T, Sugiura M. 1987. Both RNA editing y RNA cleavage are required for translation of tobacco chloroplast *ndhD* mRNA: a possible regulatory mechanism for the expression of a chloroplasts operon consisting of functionally unrelated genes. *EMBO J*. 16: 6804-6811.
- Hirose T, Sugiura M. 1996. Cis-acting elements and trans-acting factors for accurate translation of chloroplast *psbA* mRNAs: development of an *in vitro* translation system from tobacco chloroplasts. *EMBO J*. 15: 1687-1695.
- Hirose T, Sugiura M. 2001. Involvement of a site specific trans-acting factor and a common RNA binding protein in the editing of chloroplast mRNA: development of a chloroplast *in vitro* RNA editing system. *EMBO J*. 20: 1144-52.
- Horvath D, Olson P. 1998. Cloning y characterization of cold-regulated glycine rich RNA-binding protein genes from leafy spurge (*Euphorbia esula* L.) and comparison to heterologous genomic clones. *Plant Mol. Biol.* 38: 531-538.
- Hsu-Ching C, Stern D. 1991. Specific ribonuclease activities in spinach chloroplasts promote mRNA maturation and degradation. *J Biol Chem*. 266. 24205-24211.
- Ingelbrecht I, Herman L, Dekeyser R, Van Montagu M, Depicker A. 1989. Different 3' end regions strongly influence the level of gene expression in plant cell. *Plant Cell*. 1: 671-680.
- Jenkins B, kulhanek D, Barkan A. 1997. Nuclear mutations that block group II RNA splicing in maize chloroplasts reveal several intron classes with distinct requirements for splicing factors. *Plant Cell*. 9: 283-296.
- Jenkins B, Barkan A. 2001. Recruitment of a peptidyl-tRNA hydrolase as a facilitator of group II intron splicing in chloroplasts. *EMBO J*. 20: 872-879,
- Jorgensen R, Que Q, Stam M. 1999. Do unintended antisense transcripts contribute to sense cosuppression in plants? *TRENDS GENET* 15: 11-12.
- Jost J, Bruhat A. 1997. The formation of DNA methylation patterns and the silencing of genes. *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* 57: 217-247

- Keegstra K, Olsen L. 1989. Chloroplastic precursors and their transport across the envelope membranes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 471-501.
- Kerschen A, Napoli C, Jorgensen R, Muller A. 2004. Effectiveness of RNA interference in transgenic plants. *FEBS Letter.* 566: 223-228.
- Kim J., Mayfield S. 2002. The active site of the thioredoxin-like domain of chloroplast protein disulfide isomerase, RB60, catalyzes the redox-regulated binding of chloroplast poly(A)-binding protein, RB47, to the 5' untranslated region of *psbA* mRNA. *Plant Cell Physiol.* 43: 1238-1243.
- Kim L, Roth C. 2003. Antisense technology in molecular and cellular bioengineering. *Current Opinion Biotech.* 14: 505-511.
- Klein R, Mullet J. 1990. Light-induced transcription of chloroplast genes *psbA* transcription is differentially enhanced in illuminated barley. *J Biol Chem.* 265: 1895-1902.
- Kudla J, Hayes R, Gruissem W. 1996. Polyadenylation accelerates degradation of chloroplast mRNA. *EMBO J.* 15: 7137-7146.
- Kugita M, Yamamoto Y, Fujikawa T, Matsumoto T, Yoshinaga K. 2003. RNA editing in horwort chloroplasts makes more than half the genes functional. *Nucleic Acids Res.* 31: 2417-2423.
- Kumapatla S, Chandrasekharan M, Iyer L, Li G, Hall T. 1998. Genome intruder scanning and modulation systems and transgene silencing. *Trends Plant Scie.* 3: 97-104.
- Lahmy S, Barneche F, Derancourt J, Filipowicz W, Delsey M, Echeverria M. 2000. A chloroplast RNA binding protein: a new member of the PPR family. *FEBS Lett.* 480: 255-260.
- Laemmli U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
- Li Y, Sugiura M. 1990. Three distinct ribonucleoproteins from tobacco chloroplasts: each contains a unique amino terminal acidic domain and two ribonucleoprotein consensus motifs. *EMBO J.* 9: 3059-3066.
- Li Y, Sugiura M. 1991. Nucleic acid-binding specificities of tobacco chloroplast ribonucleoproteins. *Nucleic Acids Res.* 19: 2893-2896.
- Lisitsky I, Liveanu V, Schuster G. 1994. RNA-binding activities of the different domains of a spinach chloroplast ribonucleoprotein. *Nucleic Acids Res.* 22: 4719-4724.

- Lorkovic Z, Barta A. 2002. Genome analysis: RNA recognition motif (RRM) and K homology (KH) domain RNA-binding proteins from the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.* 30: 623-635.
- Matzke M, Matzke A. 1998. Epigenetic silencing of plant transgenes as a consequence of diverse cellular defense responses. *Cell Mol Life Sci.* 54: 94-103.
- Mar A, Pages M. 1998. Plant proteins containing the RNA-recognition motif. *TRENDS PLANT SCI.* 3: 15-21.
- Marchant A, Malcolm B. 1998. The *Arabidopsis* AUX1 gene: a model system to study mRNA processing in plants. *Plant Mol Biol.* 36: 463-471.
- McCormac D, Litz H, Wang J, Gollnick P, Berry J. 2001. Light associated and processing dependent protein binding to 5' regions of *rbcL* mRNA in the chloroplasts of a C₄ plant. *J Biol Chem.* 276: 3476-3483.
- Memon A, Meng B, Mullet J. 1996. RNA-binding proteins of 37/38 kDa bind specifically to the barley chloroplast *psbA* 3'-end untranslated RNA. *Plant Mol. Biol.* 30: 1195-1205.
- Merendino L, Falciatore A, Rochaix J. 2003. Expression and RNA binding properties of the chloroplast ribosomal protein S1 from *Chlamydomonas reinhardtii*. 53: 371-382.
- Meyerowitz E. 1987. *Arabidopsis thaliana*. *Annu. Rev. Genet.* 21: 93-111.
- Meyerowitz E. 1996. *Arabidopsis* as a model organism. Cogito Learning Media INC. San Francisco. USA. 29.
- Miczak A, Kaberdin V, Wei C, Lin-Chao S. 1996. Protein associated with RNase E in a multicomponent ribonucleolytic complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 3865-3869.
- Mieszczyk M, Klahre U, Levy J, Goodall G, Filipowicz W. 1992. Multiple plant RNA binding proteins identified by PCR: expression of cDNAs encoding RNA binding proteins targeted to chloroplasts in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Mol. Gen. Genet.* 234: 390-400.
- Miller WA, Waterhouse PM, Brown JW, Browning KS. 2001 The RNA world in plants: Post-transcriptional control III. *Plant Cell* 13: 1710-17
- Mittelsten O, Paszkowski J, Potrykus I. 1991. Reversible inactivation of a transgene in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* 228: 104-112.
- Miyamoto T, Obokata J, Sugiura M. 2002. Recognition of RNA editing sites is directed by unique proteins in chloroplasts: biochemical identification of cis-acting elements and

- trans-acting factors involved in RNA editing in tobacco y pea chloroplasts. *Mol. Cell. Biol.* 22: 6726-34.
- Monde RA, Schuster G, Stern DB. 2000. Processing and degradation of chloroplast mRNA. *Biochimie* 82: 573-82.
- Monde RA, Greene JC, Stern DB. 2000. The sequence and secondary structure of the 3'UTR affect 3'-end maturation, RNA accumulation, and translation in tobacco chloroplasts. *Plant Mol Biol.* 44: 529-542.
- Mohr G, Lambowitz A. 2003. Putative proteins related to group II intron reverse transcriptase/maturases are encoded by nuclear genes in higher plants. *Nucleic Acids Res.* 31: 647-652.
- Mullet J. 1988. Chloroplast development and gene expression. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39: 475-502.
- Nakamura T, Ohta M, Sugiura M, Sugita M. 1999. Chloroplast ribonucleoproteins are associated with both mRNAs and intron-containing precursor tRNAs. *FEBS Letter.* 460: 437-441.
- Nakamura T, Ohta M, Sugiura M, Sugita M. 2001. Chloroplast ribonucleoproteins function as a stabilizing factor of ribosome-free mRNA in the stroma. *J Biol Chem.* 276: 147-152.
- Nichols K, Heck G, Fernyez D. 1997. Simplified selection of transgenic *Arabidopsis thaliana* seed in liquid culture. *Biotechniques* 22: 62-63.
- Nickelsen J. 2003. Chloroplast RNA-binding proteins. *Curr. Genet.* 43: 392-399
- Nocker S, Vierstra R. 1993. Two cDNAs from *Arabidopsis thaliana* encode putative RNA binding proteins containing glycine-rich domains. *Plant Mol. Biol.* 21: 695-699.
- Ohta M, Sugita M, Sugiura M. 1995. Three types of nuclear genes encoding chloroplast RNA-binding proteins (cp29, cp31 y cp33) are present in *Arabidopsis thaliana*: presence of cp31 in chloroplast and its homologue in nucleic/cytoplasms. *Plant Mol. Biol.* 27: 529-539.
- Ossenbühl F., Hartmann K., Nickelsen J. 2002. A chloroplast RNA binding proteins from stromal thylakoid membranes specifically binds to the 5' untranslated region of the *psbA* mRNA. *Eur. J. Biochem.* 269. 3912-3919.

- Ostheirmer G, Williams-Carrier R, Belcher S, Osborne E, Gierke J, Barkan A. 2003. Group II intron splicing factors derived by diversification of an ancient RNA-binding domain. *EMBO J.* 22: 3919-3929.
- Perron K, Glodschmidt-Clermont M, Rochaix J. 1999. A factor related to pseudouridine synthases is required for chloroplast group II intron trans-splicing in *Chlamydomonas reinhardtii*. *EMBO J.* 18: 6481-6490.
- Perron K, Glodschmidt-Clermont M, Rochaix J. 2004. A multiprotein complex involved in chloroplast group II intron splicing. *RNA.* 10: 704-711.
- Pfannschmidt T, Nilsson A, Tullberg A, Link G, Allen J. 1999. Direct transcriptional control of the chloroplast genes *psbA* and *psaAB* adjusts photosynthesis to light energy distribution in plants. *IUBMB life.* 48: 271-276.
- Phayre D. 2000. Cloning and in vivo analysis of a nuclear encoded chloroplast localized 28KDa RNP binding protein. Doctor. Plant Biology. University of California at Berkeley.
- Pickford AS, Cogoni C. 2003. RNA mediated gene silencing. *Cell Mol. Life Sci.* 60: 871-882.
- Pring D, Brennicke A, Schuster W. 1993. RNA editing gives a new meaning to the genetic information in mitochondria and chloroplasts. *Plant Mol. Biol.* 21: 1163-1170.
- Pyke K, Page A. 1998. Plastid ontogeny during petal development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 116: 797-803.
- Que Q, Wang H, English J, Jorgensen R. 1997. The frequency and degree of cosuppression by sense chalcone synthase transgene are dependent on transgene promoter strength and are reduced by premature nonsense codons in the transgene coding sequence. *Plant Cell.* 9: 1357-1368.
- Quigley F, Villiot M, Mache R. 1991. Nucleotide sequence and expression of a novel glycine-rich protein gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 17: 949-952.
- Reddy M, Nair S, Singh B, Mudgil Y, Tewari K, Sopory S. 2001. Cloning and expression of a nuclear encoded plastid specific 33 KDa ribonucleoprotein gene (33RNP) from pea that is light stimulated. *Gene.* 263: 179-187.
- Rivier C, Glodschmidt-Clermont M, Rochaix J. 2001. Identification of an RNA-protein complex involved in chloroplast group II intron trans-splicing in *Chlamydomonas reinhardtii*. *EMBO J.* 20: 1765-1773.

- Robles H. 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. Química Farmacéutica Biológica. Bioquímica. Facultad de Química. UNAM.
- Robida M, Merhige P, Hollingsworth M. 2002. Proteins are shared among RNA-protein complex that form in the 5' untranslated regions of spinach chloroplast mRNAs. *Curr. Genet.* 41: 53-62.
- Rodermel S. 2001. Pathways of plastid to nucleus signaling. *TRENDS SCI PLANT* 6: 471-478.
- Rott R, Drager R, Stern D, Schuster G. 1996. The 3' untranslated regions of chloroplast genes in *Chlamydomonas reinhardtii* do not serve as efficient transcriptional terminators. *Mol. Gen. Genet.* 252: 676-683.
- Roy H, Bloom M, Milos P, Monroe M. 1982. Studies on the assembly of large subunits of ribulose biphosphate carboxylase in isolated pea chloroplasts. *J Cell Biol.* 94: 20-27
- Roy H, Cannon S. 1988. Ribulose bisphosphate carboxylase assembly: what is the role of the large subunit binding protein. *Trends Biochem Sci.* 13:163-165.
- Sachetto-Martins G, Franco LO, de Oliveira DE. 2000. Plant glycine-rich proteins: a family or just proteins with a common motif? *Biochem. Biophys. Acta* 1492: 1-14.
- Saldanha R, Mohr G, Belfort M, Lambowitz A. 1993. Group I and group II introns. *FASEB J.* 7: 15-24.
- Shteyman-Kotler A, Schuster G. 2000. RNA-binding characteristics of the chloroplast S1-like ribosomal protein CS1. *Nucleic Acids Res.* 38: 3310-3315.
- Shen Y, Danon A, Chistopher D. 2001. RNA binding-proteins interact specifically with the *Arabidopsis* chloroplast *psbA* mRNA 5' untranslated region in a redox-dependent manner. *Plant Cell Physiol.* 42: 1071-1078.
- Schuster G, Gruijssem 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 mRNA in the chloroplast. *Plant Physiol.* 120: 937-944.
- Sijen T, Wellink J, Hiriart J, Kammen V. 1996. RNA-mediated virus resistance: rol of repeated transgenes and delineation of targeted regions. *Plant Cell.* 8: 2277-2294.

- Siomi H, Dreyfuss G. 1997. RNA-binding proteins as regulators of gene expression. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7: 345-353.
- Somanchi A, Mayfield SP. 1999. Nuclear-chloroplast signalling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 404-409.
- Stern DB, Gruissem W. 1987. Control of plastid gene expression 3' inverted repeats act as mRNA processing and stabilizing elements but do not terminate transcription. *Cell.* 51: 1145-57.
- 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.
- Sugiura M. 1992. The chloroplast genome. *Plant Mol Biol.* 19: 149-168
- Surpin M, Larkin RM, Chory J. 2002. Signal transduction between the chloroplast and the nucleus. *Plant Cell.* 14: 5327-38
- Susi P, Hohkuri M, Wahlroos T, Kilby N. 2004. Characteristics of RNA silencing in plants, similarities and differences across kingdoms. *Plant Mol. Biol.* 54: 157-174.
- Symmons M, Jones G, Luisi B. 2000. A duplicated fold is the structural basis for polynucleotide phosphorylase catalytic activity, processivity and regulation. *Structure Fold Des.* 11: 1215-1226.
- Taylor W. 1989. Regulatory interactions between nuclear and plastid genomes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 211-233.
- Thomas C, Jones L, Baulcombe D, Maule A. 2001. Size constraints for targeting post-transcriptional gene silencing and for RNA-directed methylation in *Nicotiana benthamiana* using a potato virus X vector. *Plant J.* 25: 417-425.
- Till B, Schmitz-Linneweber C, Williams-Carrier R, Barkan A. 2001. CRS1 is a novel group II intron splicing factor that was derived from a domain of ancient origin. *RNA.* 7: 1227-1238.
- 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 Ciencias Bioquímicas. Departamento de Bioquímica. Facultad de Química. UNAM.

- Towbin M, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA. 76: 4350-4354.
- Tsudzuki T, Wakasugi T, Sugiura M. 2001. Comparative analysis of RNA editing sites in higher plant chloroplasts. J. Mol. Evol. 53: 327-332.
- Vaistij F, Boudreau E, Lemaire S, Goldschmidt C, Rochaix J. 2000. Characterization of Mbb1, a nucleosome-encoded tetratricopeptide repeat-like protein required for expression of the chloroplast *psbB/psbT/psbH* gene cluster in *Chlamydomonas reinhardtii*. Proc Natl Acad Sci USA. 97: 14813-14818.
- Van der Krol A, Mur L, Beld M, Mol J, Stuuuitje A. 1990. Flavonoid genes in *petunia*: addition of limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. Plant Cell. 2: 291-299.
- Van Dooren GG, Schwartzbach SD, Osafune T, McFadden SI. 2001. Translocation of proteins across the multiple membranes of complex plastids. Biochim. Biophys. Acta. 1541: 34-53.
- Van Houdt H, Van Montagu M, Depicker A. 2000. Both sense y antisense RNAs are targets for the sense transgene-induced posttranscriptional silencing mechanism. Mol. Gen. Genet. 263: 995-1002.
- Van Leeuwen W, Mlynárová L, Nap J, Van Der Plas L, Van Der Krol A. 2001. The effect of MAR elements on variation in spatial and temporal regulation of transgene expression. Plant Mol. Biol. 47: 543-554.
- Vaucheret H, Báclin CH, Fagard M. 2001. Post-transcriptional gene silencing in plants. J. Cell Sci. 114: 3083-3091.
- Vogel J, Börner T, Hess W. 1999. Comparative analysis of splicing of the complete set of chloroplast group II introns in three higher plant mutants. Nucleic Acids Res. 27: 3866-3874
- Weigel D, Clark S. 1996. Sizing up the floral meristem. Plant Physiol. 112: 5-10.
- Weesthoff P, Herrmann R. 1988. Complex RNA maturation in chloroplasts. Eur. J. Biochem. 171: 551-564.
- Willmitzer L. 1988. The use of transgenic plants to study plant gene expression. TRENDS GENET. 4: 13-18.

- Yang J, Schuster G, Stern DB. 1996. CSP41, a sequence-specific chloroplast mRNA binding, is an endoribonuclease. *Plant Cell*. 8: 1409-1420.
- Yehudai-Resheff S, Hirsh M, Schuster G. 2001. Polynucleotide phosphorylase functions as both an exonuclease and a poly(A) polymerase in spinach chloroplasts. *Mol. Cell Biol.* 21: 5408-5416.
- Yenofsky R, Fine M, Pellow J. 1990. A mutant neomycin phosphotransferase II gene reduce the resistance of transformants to antibiotic selection pressure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 87: 3435-3439.
- Yu L, Chamberly H, Lafontaine J, Tabaeizadeh Z. 1996. Negative regulation of gene expression of a novel proline-, threonine-, and glycine-rich protein by water stress in *Lycopersicon chilense*. *Genome* 39: 1185-1193.
- Yu H, Kumar P. 2003. Post-transcriptional gene silencing in plants by RNA. *Plant Cell Rep.* 22: 167-174.
- Zhang H, Scheirer D, Fowle W, Goodman H. 1992. Expression of antisense or sense RNA of an ankyrin repeat-containing gene blocks chloroplast differentiation in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 4: 1575-1588.

Apéndice

Construcción de las plantas transgénicas.

Para la construcción de las plantas transgénicas, se utilizó el vector SLJ7292 el cual presenta las siguientes características. La construcción esta bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor. Además de presentar el gen de resistencia a kanamicina que se utiliza como elemento de selección de las plantas transformadas. El gen de la cp29 de *A. thaliana* fué insertado dentro del vector en orientación sentido y antisentido, bajo el control del promotor 35S. Por lo cual se generaron tres construcciones el vector sin inserto, el vector con el gen de la 29RNP en orientación sentido y la última con el gen de la 29RNP en orientación antisentido.

Estas construcciones fueron utilizadas para transformar plantas de *Arabidopsis thaliana* utilizo el protocolo de infiltración al vacío. Los plásmidos generados fueron utilizados para transformar a *Agrobacterium tumefaciens*. Las plantas fueron puestas junto con las bacterias en una atmósfera al vacío. Las semillas generadas de esta transformacion se seleccionaron en medio MS con kanamicina (50 mg/ml). Y se consideraron como semillas de la generación T₀. La transformación de las plantas fue realizada por la Dra. Herminia Loza durante su estancia post-doctoral en la Universidad de Berkeley en San Francisco.

El vector SLJ7292 proviene de las modificaciones realizadas al vector SLJ44024. Estos vectores pertenecen a una familia de plásmidos los cuales presentan en los extremos lo brazos del T-DNA que permite la recombinación en el genoma vegetal.

Medio MS (Murashige y Skoog, 1962).

Solución I

KNO ₃	1.9 g
NH ₄ NO ₃	1.65 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.44 g
MgSO ₄	0.37 g
KH ₂ PO ₄ · H ₂ O	0.17 g

Solución II

MnSO ₄ · H ₂ O	16.9 mg
--------------------------------------	---------

ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6 mg
H ₃ BO ₃	6.2 mg
KI	0.083 mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	25 µg
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	250 µg
CoCl ₂ ·6H ₂ O	25 µg

Solución III

FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8 mg
C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₁₀ Na ₂ ·2H ₂ O	37.3 mg

Solución IV

Glicina	2 mg
Myo-Inositol	100 mg
Tiamina-HCL	0.1 g
Ac. Nicotínico	0.5 g
Piridoxina-HCl	0.5 g

Sacarosa 1.5g

Agar bacteriológico 16 g

Disolver en partes iguales cada solución, 200 ml de cada una y ajustar el pH a 5.7 con NaOH. Llevar a un volumen final de 2000 ml. Esterilizar por autoclave, exactamente 18 minutos para evitar la caramelización de la sacarosa. Posteriormente adicionar Kanamicina antes de vaciar en las cajas

Kanamicina stock 10mg/ml

Kanamicina 0.1 g

Disolver en 10ml de agua desionizada y esterilizar por filtración. Adicionar 5 ml por cada litro de medio MS para obtener una concentración de 50 µg/ml.

Buffer de extracción de proteínas 2X

Tris base pH 7.5	200 mM
EDTA	10 mM
Sacarosa	0.6 M
EGTA	10 mM
MgCl ₂	10 mM

β -Mercaptoetanol	80 mM
Pefablock	1 mg/ml
Pepstatin	2 μ g/ml
Leuceptina	1 μ g/ml
Bestatin	80 μ g/ml

Se pesan todos los componentes hasta el cloruro de magnesio y se disolvieron en agua desionizada. Se esteriliza la solución en autoclave. Antes de iniciar la extracción se adiciona el β -Mercaptoetanol y los inhibidores de proteasas, los cuales se agregan a partir de soluciones stock preparadas y mantenidas a -20°C . Esta solución se utiliza 1X.

SDS-PAGE

Procedimiento

1. Correr un gel de SDS-PAGE (Laemmli 1970), el cual se basa en el uso de soluciones amortiguadoras con diferentes pH, que genera un pH discontinuo y un gradiente de voltaje en el gel, lo que permite la separación de las proteínas dependiendo de sus cargas netas. La utilización de la poliacrilamida en el gel permite la formación de una red o malla que también separa las proteínas por su peso.

% de acrilamida	Intervalo de tamaño (KDa)
5%	36 – 205
7.5%	24 – 205
10%	14 – 205
12.5%	14 – 66
15%	14 – 42

Tabla 3. Pesos en KDa que pueden separarse por un porcentaje adecuado de acrilamida.

Se preparan los geles de acrilamida con los siguientes componentes (Preparación de soluciones en el apéndice).

Gel separador

Gel separador

Soluciones	12%	15%
Agua desionizada	1.4 ml	1 ml
Solución de acrilamida bisacrilamida	1.6 ml	2 ml
Buffer separador	1 ml	1 ml
APS 20%	25 μ l	25 μ l
TEMED	2.5 μ l	2.5 μ l

Gel concentrador

Soluciones	12% y 15%
Agua desionizada	1 ml
Buffer apilador	444 μ l
Solución de archilamida y bisacrilamida	300 μ l
APS 20%	20 μ l
TEMED	5 μ l

2. En un tubo falcon de 15 ml se mezclaron perfectamente los componentes para el gel separador y se vacían en los sándwiches de vidrio.
3. Se mezclaron los componentes del gel de concentrador y se vaciaron sobre el gel separador e inmediatamente después se colocaron los peines para la formación de los pozos para cargar las muestras.
4. Después de medir la concentración de proteínas, se separaron las muestras llevándolas todas a un volumen semejante, incluyendo el buffer de carga (ver apéndice) que debe quedar al final a una concentración 1X. Para ajustar los volúmenes se utilizó la solución para extracción de proteínas.
5. Se pusieron las muestras en el baño de agua a ebullición por 10 minutos y se transfirieron a un baño de hielo con agua.
6. Se cargaron las muestras y el marcador de peso molecular y se corrió el gel a 100V en el buffer de corrida.

7. Si el gel se va a transferir no debe teñirse con azul de Coomassie ya que las proteínas se fijan en el gel y no pueden ser transferidas. Para teñir el gel se utiliza la solución de Coomassie (ver apéndice) durante 1 hora y posteriormente se destiñe con solución fijadora y desteñidora (ver apéndice).

Western blot

Se utiliza el método descrito por Towbin *et al.* (1979).

1. Después de separar las proteínas el gel se dejó 15 min en el buffer de transferencia para equilibrar el gel (ver apéndice).
2. Se cortó una membrana de PVDF de 6x8.5 cm y se mojó en metanol para hidratar la membrana, posteriormente se dejó en el buffer de transferencia por 15 min.
3. Se colocaron seis pedazos de papel 3MM de 6.5x9cm y al igual que la membrana se humedece en la solución para transferir,
4. Se ensambló el cassette de acuerdo al instructivo anexo y se instaló en el aparato.
5. Se corrió la electrotransferencia a 100 V por 1 hora.
6. Se desmontó la electroforesis y la membrana se tiñó en solución de Ponceau S (ver apéndice) por 10 minutos. Se retiró la membrana de la solución y se lavó con agua desionizada hasta que las bandas de las proteínas fueron visibles.
7. Tomar una fotografía para guardar la imagen como prueba de la calidad de los extractos, la cantidad que se agregó en cada pozo y la eficiencia de la transferencia. Este paso es muy importante para demostrar que las diferencias en la concentración de proteína, presentes en la película fotográfica, que se llegaron a observar, no se deben a que existe una menor cantidad de proteína cargada en el gel.
8. Desteñir la membrana con TBS 1X (ver apéndice) durante 5 min antes de bloquear.
9. Bloquear la membrana con leche descremada (Svelty) al 5% en TBS 1X (ver apéndice) durante 10 min. La cantidad de solución necesaria es aquella con la cual la membrana quede totalmente sumergida (5 a 10 mL). En algunos protocolos se menciona que después de bloquear la membrana, ésta se lava. Sin embargo, esto no es necesario ya que lo que se pretende es cubrir todas aquellas zonas en las cuales el anticuerpo se pueda unir inespecíficamente y si se lava la membrana pueden aumentar las uniones inespecíficas.

10. Adicionar el primer anticuerpo diluido en TBS 1X con leche descremada al 5%. La dilución a la cual se utilice este anticuerpo dependerá de la reactividad del anticuerpo por la proteína que reconoce. Para saber a que concentración se debe utilizar el anticuerpo es necesario realizar una titulación previa. En este caso la dilución empleada fue de 1:1500 para el anticuerpo anti 24RNP.
11. Incubar el primer anticuerpo una hora a 37°C o toda la noche a 4°C en agitación constante.
12. Lavar la membrana con TBS-T 1X (ver apéndice) 15 min dos veces.
13. Adicionar el segundo anticuerpo a una dilución de 1:2000 en TBS 1X con 3% de leche descremada. En este caso, dado que el primer anticuerpo fue desarrollado en conejo, el segundo anticuerpo debe ser anti-IgG de conejo, acoplado a la peroxidasa de rábano. Incubar durante una hora a temperatura ambiente con agitación constante.
14. Hacer dos lavados de 15 min cada uno, con TBS-T.

Revelado

A partir de este momento todo se debe de realizar en el cuarto oscuro con la luz apagada, de acuerdo al protocolo del ECL (Amersham Pharmacia Biotech)

1. Escurrir la membrana sobre un pedazo de papel, para quitar el exceso de solución de lavado y colocarla sobre un cartón que esté cubierto con plástico.
2. Mezclar 500 µl de cada una de las soluciones 1 y 2 (las cuales contienen el sustrato específico para la peroxidasa, que al llevar a cabo la reacción, genera luz) y agregar sobre la membrana, de forma tal que la cubra completamente.
3. Escurrir el exceso de solución de revelado y cubrir la membrana con un plástico.
4. Colocar una película fotográfica específica (Kodak Biomax Light Film No. de catálogo 17 8207) sobre la membranas. El tiempo de exposición dependerá de que tan intensa sea la señal, si se logra ver un poco de luz a simple vista con la luz apagada solamente es necesario dejar la exposición durante 15, 30 seg o un minuto máximo. Si no se logra ver nada se puede dejar durante 3 ó 5 min. Es muy importante que cuando coloques la película no la muevas ya que si esto sucede aparecerán byas que no existen o se verá la señal borrosa.
5. La película fotográfica se debe cortar de una esquina para que permita ubicar la orientación de la membrana.

6. Para revelar la película, introducirla durante 5 min en la solución de revelado (Kodak No. de catálogo 190-0943) agityo constantemente para que la solución cubra a toda la película.
7. Sacar la película y enjuagarla abundantemente en agua corriente. Si no lavas lo necesario la película se vera opaca. Aproximadamente hay que enjagar durante 5 min.
8. Introducir la película en la solución fijadora (Kodak No. de catálogo 190-1875) durante uno a tres min. Durante este período se debe agitar el recipiente para que la solución cubra completamente la película.
9. Lavar nuevamente con agua corriente y dejar escurriendo hasta que la película se seque.
10. Posteriormente hay que alinear la película con la fotocopia que se obtuvo de la membrana teñida con Ponceu, para localizar e dientificar el tamaño de la señal.
11. Para guardar los resultados hay que recortarla película donde esta localizada la señal del tamaño de la membrana y señalar los marcadores de peso molecular así como los que se tiene en cada carril, la fecha de realización la concentración del gel del cual se partió y las observaciones pertinentes.

Solución de acrilamida/bisacrilamida

Acrilamida	30 g
Bisacrilamida	0.8 g

Se pesan los componentes y se disuelven en 80ml de agua desionizada en una parrilla con agitación y calor moderado. Se filtra la mezcla a través de un papel Whatman No. 1 u otro de poro grye, después de que se haya disuelto completamente y se afora a 100 ml con agua desionizada en una probeta. Se almacena a 4°C en un frasco protegido de la luz.

Buffer separador (25X)

Tris base	1.5 M
SDS 20%	2 ml

Ajustar el pH a 8.8 con HCl 12N

Se pesa el Tris y se disuelve en 80ml de agua desionizada y se ajusta el pH. Se agrega el SDS y se afora a 100ml. Se almacena a 4°C.

Buffer apilador (25X)

Tris base	0.5 M
SDS 20%	2 ml

Ajustar a pH 6.8 con HCl 12 N

Se pesa el Tris y se disuelve en 80ml de agua desionizada y se ajusta el pH. Se agrega el SDS y se afora a 100ml. Se almacena a 4°C.

Buffer de carga (5X)

Tris base	1 M
Glicerol	5 ml
SDS	0.5 g
Azul de bromofenol	0.2 g

β -Mercaptoetanol

Se pesan o se miden los componentes y se llevan a 10 ml con agua desionizada. Se almacena a temperatura ambiente. Inmediatamente antes de usar se agrega 4 μ l de β -Mercaptoetanol por cada 20 μ l de buffer de carga.

Buffer de corrida (10X)

Tris base	3 g
Glicina	14.4 g
SDS	1 g

Se pesa el Tris y la Glicina, se adicionan 60 ml de agua desionizada y se disuelven sobre una parrilla con agitación. Se mide el pH que debe de estar entre 8.3 y 8.8, de no ser así se vuelven a pesar los componentes debido a que no se puede ajustar el pH. Se agrega el SDS en polvo, se disuelve y se afora a 100 ml. Se almacena a 4°C. Antes de usarse se deben tomar 30ml de esta solución y aforar a 300 ml con agua desionizada.

Persulfato de amonio al 20%

Persulfato de amonio	0.2g
----------------------	------

Se pesa el reactivo y se disuelve en 5 ml de agua desionizada y se afora a 10 ml. Se hacen alicuotas de 500 μ l en tubos eppendorf de 1.5 ml y se congelan a -20°C.

Buffer de transferencia

Tris base	25 mM
Glicina	192 mM
Metanol reactivo analítico	20% v/v

Se disuelve el Tris, la glicina en 100 ml de agua desionizada. Se adiciona el metanol y se afora con agua desionizada.

Solución de Ponceau S.

Ponceau S	0.04 g
Ácido acético glacial	2 ml

Se pesa el Ponceau y se disuelve en 10 ml de agua desionizada, se adiciona el ácido acético y se afora a 40 ml con agua desionizada. Se almacena a temperatura ambiente.

TBS (pH 7.6)

Tris base	2.4 g
NaCl	8 g

Se pesan los reactivos y se disuelven en 600 ml de agua desionizada en una parrilla con agitación. Se ajusta el pH a 7.6 con HCl concentrado. Se afora a 1000 ml con agua desionizada.

TBS-T

TBS	200 ml
Tween-20	2 μ l

Se adiciona el Tween-20 al TBS y se mezcla.

Solución de Coomassie para tefir geles.

Azul brillante Coomassie	0.0250 g
Metanol grado técnico	45.4 ml
Agua destilada	45.4 ml
Ácido acético glacial	9.2 ml

Se pesa el Coomassie y se disuelve en 10 ml de agua desionizada, una vez disuelto se adicionan los demás reactivos y se afora a 100 ml y se mezcla perfectamente. Se almacena a temperatura ambiente.

Fijador y desteñidor

Ácido acético glacial 18.75 ml

Metanol grado técnico 50 ml

Se miden los reactivos y se aforan a 250 ml, con agua desionizada. Se almacena a temperatura ambiente.