



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“Aislamiento y caracterización de un extracto
proteico de cloroplastos de *Arabidopsis thaliana*
con capacidad de procesar el extremo 3’ de
mRNAs cloroplásticos”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

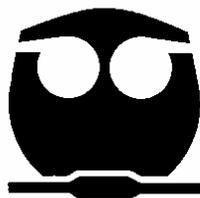
P R E S E N T A:

DENIA COLOAPA SOTO

Tutora: DRA. HERMINIA LOZA TAVERA

MÉXICO, D. F.

2006





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

Presidente	Profa. Alicia Cervantes Peredo
Vocal	Profa. Marina Gavilanes Ruiz
Secretario	Profa. Herminia Loza Tavera
1er. Suplente	Prof. Euclídes Ávila Chávez
2º. Suplente	Profa. María Benita Leonor Fernández Salgado

SITIO EN DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 105, Conjunto E, Facultad de Química, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, UNAM.

ASESORA DEL TEMA:

Dra. Herminia Loza Tavera

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dr. Martín Pedro Vargas Suárez

SUSTENTANTE:

Denia Coloapa Soto

AGRADECIMIENTOS

A la Dirección General de Asuntos de Personal Académico DGAPA-PAPIT (proyecto IN225001) y PAIP-FQ-UNAM 6290-04 por el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo.

A la Coordinación de Superación Académica (CSA) de la Facultad de Química, por la beca otorgada a través de Subprograma 127 “Formación Básica en Investigación”, período 2005-2006.

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

A la UNAM y a la Facultad de Química por permitirme ser uno de sus miembros y poder gozar de una de las mejores formaciones académicas que existe en el país.

A la Dra. Herminia Loza Tavera por invitarme a formar parte de su equipo de trabajo. Por sus enseñanzas, así como el tiempo y esfuerzo dedicados a este proyecto.

Al Dr. Martín Vargas Suárez por la asesoría técnica, consejos y valiosas contribuciones a este proyecto; pero sobre todo, por brindarme su amistad.

A la M. C. María del Carmen Parra González por sus consejos, apoyo y ayuda incondicional; además de ser excelente amiga y participar en mi formación académica.

A las Dras. Alicia Cervantes Peredo y Marina Gavilanes Ruiz por sus comentarios y valiosas contribuciones para enriquecer este trabajo.

A los miembros del jurado que formaron parte en mi formación académica.

A mis amigos del laboratorio 105 y del conjunto E: Alex, Viridiana, Alina, Mayra, Agustín, Miguel, Luisa, Claudia, Luzdei, Miriam, Selene, Pilo, César, Liliana y Arturo por todo su apoyo, consejos y alegrías compartidas.

A mis amigos: Ana, Margarita, Aurora, Miriam, Marlen, Nancy, Paul, Jorge, Norma, Susana, Blanca, Isela, Gerardo, Claudia, Lorena y Ricardo por formar parte de los mejores momentos que pude haber vivido en la Facultad.

DEDICATORIA

La educación no la recibimos de una sola persona, sino de todas, por eso, creo injusto dedicar este trabajo a unas cuantas personas, siendo que de todas fue el mérito de inculcarme lo que sé y lo que soy. Ciertamente que unos tienen más mérito, pero no me olvido de aquellos que creyeron aportar poco y que para mí fue mucho.

Sea pues para ti, que me ayudaste en la realización de este trabajo, la dedicatoria de este humilde trabajo que te ofrezco con la misma humildad de corazón.

*A mis padres:
Alfredo Coloapa López y Ascención Soto García
Por ser los principales artífices de mi educación*

*A mis hermanos:
Edgar y Nancy
Por todos y cada uno de los momentos que hemos compartido*

*A mi sobrino:
Edgar Coloapa Vázquez
Por su cariño y ternura*

*A Carlos Peña Chavarría
Por ser la persona que ilumina mi vida*

*A mi mejor amigo:
Ricardo Coloapa Vidal
Por su amistad sincera e incondicional*

ÍNDICE	PAG.
ABREVIATURAS	<i>i</i>
1. RESUMEN	<i>iii</i>
2. ANTECEDENTES	1
2.1. Los plastidios	1
2.2. Organización de los genes cloroplásticos	3
2.3. Regulación de la expresión genética a nivel post-transcripcional	4
2.4. Participación de factores <i>trans</i> en el procesamiento del 3'UTR de mRNA cloroplásticos	5
2.4.1. Proteínas pequeñas de unión a RNA (RNP)	5
2.4.2. Las RNP de cloroplasto	6
2.5. <i>Arabidopsis thaliana</i>	8
3. HIPÓTESIS	12
4. OBJETIVOS	12
4.1. Objetivos particulares	12
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	13
6. MATERIALES Y MÉTODOS	17
6.1. Cultivo de <i>Arabidopsis thaliana</i>	17
6.2. Clonación de los 3'UTR de los genes cloroplásticos <i>psbA</i> , <i>petD</i> y <i>rbcL</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> y <i>rbcL</i> de espinaca	18
6.2.1. Extracción de DNA genómico de <i>A. thaliana</i>	18
6.2.2. PCR y clonación	20
6.3. Extracción y purificación del extracto de procesamiento de 3'UTR de cloroplastos de <i>A. thaliana</i>	23
6.3.1. Aislamiento de cloroplastos y preparación de extractos de procesamiento de RNA de <i>A. thaliana</i>	23
6.4. Análisis de proteínas	28
6.4.1. Cuantificación de proteínas (Bradford)	28
6.4.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)	30
6.4.3. Tinción de proteínas con plata	32
6.5. Transcripción <i>in vitro</i> de los 3'UTR	33
6.6. Análisis de los 3'UTR de mensajeros cloroplásticos de <i>A. thaliana</i>	35
6.6.1. Electroforesis de RNA en geles de poliacrilamida desnaturalizante	35
6.6.2. Procesamiento de RNA <i>in vitro</i>	37
6.6.3 Cruzamiento de RNA-proteína con luz-ultravioleta (X-UV)	39
7. RESULTADOS	41
7.1. Clonación de los extremos 3'UTR de los genes <i>psbA</i> , <i>petD</i> y <i>rbcL</i>	41
7.1.1. Análisis teórico del plegamiento de las secuencias de los extremos 3'UTR de <i>Arabidopsis thaliana</i> y <i>rbcL</i> de espinaca	47
7.2. Transcripción <i>in vitro</i> de los extremos 3'UTR	51

7.3. Proteínas cloroplásticas de los EP de <i>A. thaliana</i> y <i>S. oleoracea</i>	52
7.4. Patrones de procesamiento de las diferentes fracciones obtenidas en la purificación del EP de <i>A. thaliana</i>	53
7.5. Interacciones <i>in vitro</i> de los diferentes 3'UTR con proteínas de unión a RNA del cloroplasto	54
7.5. Patrones de procesamiento de los EP de espinaca y <i>A. thaliana</i>	57
7.6. Efecto de la concentración de iones Mg^{2+} en el procesamiento de los 3'UTR.	60
8. DISCUSIÓN	62
8.1. Semejanza de los 3'UTR de espinaca y <i>A. thaliana</i>	62
8.2. Proteínas de unión a RNA presentes en los CI y en los EP de espinaca y <i>A. thaliana</i>	62
8.3. Entrecruzamiento de los EP de espinaca y <i>A. thaliana</i> con los diferentes 3'UTR	64
8.4. Patrones de procesamiento de los 3'UTR de los EP de espinaca y <i>A. thaliana</i>	67
9. CONCLUSIONES	70
10. APÉNDICE	72
11. BIBLIOGRAFÍA	79

Abreviaturas

APS	Persulfato de amonio
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
BSA	Albúmina de suero de bovino
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
c.b.p	Cuanto baste para
cpm	Cuentas por minuto
CTP	Citidina 5'-trifosfato
cpRNP	Proteína cloroplástica de unión a RNA
DEAE	Dietilaminoetil
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Deoxirribonucleótidos trifosfato
EP	Extracto de procesamiento de extremos 3' de mRNA de cloroplasto
EDTA	Ácido etilendiamintetracético
GTP	Guanosina 5'-trifosfato
h	Horas
IR	Secuencias invertidas repetidas
kb	Kilobases
LB	Medio Luria-Bertani
mA	Miliamperes
min	Minutos
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
nt	Nucleótidos
³² P	Isótopo radiactivo de fósforo
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PNPasa	Polinucleótido fosforilasa
RNAsa	Ribonucleasa
RNP	Proteína de unión a RNA
rpm	Revoluciones por minuto
seg	Segundos
SN	Sobrenadante

SDS	Dodecil sulfato de sodio
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletildiamina
UTP	Uridina 5'-trifosfato
UTR	Región del mRNA no traducida (<i>untranslated region</i>)
X-UV	Entrecruzamiento por luz ultravioleta

1. RESUMEN

Los cloroplastos son los organelos vegetales en donde ocurre la fotosíntesis. Estos organelos poseen su propio material genético codificante de varias proteínas que participan directamente en la función. La regulación post-transcripcional es un mecanismo importante de control de los niveles de mRNA de los plastidios y está mediado por proteínas que están codificadas en el núcleo. Entre las proteínas que participan en el procesamiento de mRNA plastídicos, se encuentran proteínas con actividad de RNAsa (endonucleolítica y exonucleolítica) y proteínas de unión a RNA (RNA binding proteins: RNP). A través de diversas investigaciones se ha determinado que las RNP se encuentran involucradas en la estabilidad y procesamiento de los extremos 3' no traducibles (3'UTR) de los mRNA cloroplásticos, aunque no se conoce la mecánica del proceso, ni la función específica que cada una de estas proteínas desempeña. En nuestro laboratorio se ha estado trabajando en dilucidar la función de la 24RNP de espinaca en el procesamiento de los extremos 3'UTR de los mRNA cloroplásticos, incluyendo la afinidad de esta proteína por diferentes regiones de los 3'UTR y su regulación por fosforilación. *Arabidopsis thaliana* es un modelo genético importante, ya que es uno de los pocos organismos vegetales en los que se conoce la secuencia completa de su genoma y es factible de ser transformado genéticamente, por lo que se pueden generar mutantes carentes de algunas RNP, que ayudarían en determinar la función de éstas y de otras proteínas involucradas en el procesamiento de los 3'UTR cloroplásticos, ya que a nivel bioquímico se desconoce como se lleva a cabo este proceso. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue aislar y caracterizar un extracto de cloroplasto de *A. thaliana*, con capacidad de procesar los 3'UTR de mRNA cloroplásticos *in vitro*, para realizar el análisis bioquímico de este mecanismo. Para lograr dicho objetivo se obtuvo un extracto de procesamiento (EP) a partir de cloroplastos intactos lisados de *A. thaliana*. Estas plantas se cultivaron bajo un fotoperíodo de día corto (6 h luz/18 h oscuridad) por 8 semanas. Para la síntesis de los 3'UTR de mRNA cloroplásticos, que se utilizarían como sustratos en los ensayos de procesamiento *in vitro*, las secuencias de DNA de estos genes se obtuvieron por medio de la técnica de PCR, utilizando oligonucleótidos específicos y DNA total como molde. Los fragmentos amplificados fueron clonados en un vector (pBS KS (+/-) o pGEM T-Easy), bajo el control de uno de los promotores, T7 o SP6.

Los fragmentos clonados fueron secuenciados, confirmando su identidad. Para la síntesis de RNA *in vitro*, se emplearon como molde los plásmidos linearizados conteniendo los 3'UTR clonados, la RNA polimerasa correspondiente, ribonucleótidos y [$\alpha^{32}\text{P}$]-UTP. Cada uno de los 3'UTR sintetizados *in vitro* se purificaron a partir de geles desnaturalizantes de acrilamida-urea. A través del alineamiento con el programa ClustalW (Work Bench, <http://workbench.sdsc.edu>) y el plegamiento de RNA de las secuencias de los transcritos sintetizados *in vitro*, se encontró que las secuencias de los 3'UTR de los mensajeros de *petD*, *psbA* y *rbcL* de espinaca y *A. thaliana* mantienen muy conservada su estructura tallo-asa y la distancia del codón de paro al tallo-asa. El complemento de proteínas de unión a RNA de los EP de *A. thaliana* y espinaca fue analizada por ensayos de entrecruzamiento con luz ultravioleta (UV-crosslinking). En estos ensayos se encontró que en el EP de *A. thaliana* existen cuatro grupos de proteínas de unión a RNA: las que se unen de manera específica a At3'psbA y So3'psbA, una de 53 kDa; las específicas para At3'petD, de 13 y 11 kDa; las específicas para So3'rbcL y At3'rbcL, una de 67 kDa (probablemente la p67) y las que se unen a los mensajeros de una u otra especie, 120, 100, 80, 65, 56, 50, 47, 43, 38, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 29, 28, 24, 23, 20, 18, 16, 14 y 12 kDa. Algunas de las proteínas podrían ser las homólogas de la 100RNP, 55RNP, 33RNP, 31RNP, 28RNP, 24RNP, CSP55, CSP47, CSP29 y p67 de espinaca, que se ha reportado que participan en el procesamiento y degradación de los 3'UTR. En el EP de espinaca, además de aquellas proteínas descritas que intervienen en el procesamiento de los 3'UTR's, se encontró que otras de 120, 80, 70, 60, 50, 38, 36, 34, 26, 23, 20, 17, 15 y 12 kDa se unen a los diferentes extremos 3'UTR. En los ensayos de procesamiento encontramos que el EP de espinaca procesa correctamente los 3'UTR de So3'psbA, So3'petD, So3'rbcL, At3'petD y At3'rbcL, pero no el de At3'psbA. Se encontró que el EP de *A. thaliana* posee capacidad limitada de procesar los extremos 3'UTR de sus mensajeros, ya que sólo fue capaz de procesar el 3'UTR de *psbA*. Los 3'UTR de espinaca no fueron procesados correctamente por el EP de *A. thaliana*, ya que no fueron estables en el ensayo *in vitro*. Esta capacidad limitada de procesamiento puede deberse a la ausencia de proteínas específicas para el correcto procesamiento de los 3'UTR o por la baja concentración de algún factor indispensable en el correcto procesamiento de los 3'UTR de *A. thaliana*.

2. ANTECEDENTES

2.1. Plastidios

Los plastidios son organelos celulares típicamente vegetales, semiautónomos, no diferenciados, que poseen su propio material genético y la maquinaria transcripcional y traduccional necesaria para su expresión genética (Bendich, 1987). Los plastidios dan lugar a los etioplastos, amiloplastos, cromoplastos y cloroplastos por procesos de diferenciación organelar, en los que genes específicos se expresan en cada tipo de organelo (Smith, 1997). Se multiplican por bipartición y su DNA es una molécula circular que tiene de 120 a 217 kpb. Cada organelo presenta entre 22 y 900 copias de su genoma. La composición y organización del DNA son similares en plastidios fotosintéticos y no fotosintéticos (Mullet y Klein, 1987). El DNA que contienen no está asociado a la membrana interna del organelo, ni a histonas (Audersyk y Audersyk, 1996) y codifica aproximadamente 135 genes dependiendo de la especie. La mayoría de estos genes están relacionados directa o indirectamente con la fotosíntesis y con los procesos de transcripción y traducción dentro del cloroplasto (Tabla 1) (Deng y Gruissem, 1987; Mullet *et al.*, 1988; Taylor, W., 1989; Barkan *et al.*, 1994). Sin embargo, no sólo se necesitan estos genes para la síntesis de proteínas y la regulación de la expresión genética en el organelo, sino también se necesitan genes nucleares, que codifican para factores involucrados en la transcripción, el procesamiento de mRNA, splicing, estabilización del RNA y en el inicio de la traducción (Lopato *et al.*, 1996; Lopato *et al.*, 1999; Hirose y Sugiura, 2001., Fedoroff, 2002). En la oscuridad los plastidios se pueden transformar en estructuras cristalinas llamadas etioplastos que, por efecto de la luz, pueden a su vez transformarse en cloroplastos, mientras que en condiciones fisiológicamente adecuadas se transformarán en amiloplastos. En algunas partes de las plantas, tales como flores y frutos, se llevan a cabo determinados procesos que provocan la desintegración de los tilacoides y la desaparición de proteínas fotosintéticas y sus mRNA; formando otro tipo de cloroplastos denominados cromoplastos, los cuales contienen grandes cantidades de carotenoides y otros pigmentos responsables de la coloración (Smith, 1997).

Tabla 1. Genes codificados en plastidios (Schmitz-Linneweber *et al.*, 2001).

<p>Genes que codifican para RNAs</p> <p>RNAs ribosomales <i>rrn23, rrn16, rrn5, rrn4</i></p> <p>tRNA <i>trnA</i> (UGC), <i>trnC</i> (GCA), <i>trnD</i> (GUC), <i>trnE</i> (UUC), <i>trnF</i> (GAA), <i>trnG</i> (GCC), <i>trnG</i> (UCC), <i>trnH</i> (GUG), <i>trnI</i> (CAU), <i>trnI</i> (GAU), <i>trnK</i> (UUU), <i>trnL</i> (CAA), <i>trnL</i> (UAA), <i>trnL</i> (UAG), <i>trnM</i> (CAU), <i>trnM</i> (CAU), <i>trnN</i> (GUU), <i>trnP</i> (UGG), <i>trnQ</i> (UUG), <i>trnR</i> (ACG), <i>trnR</i> (UCU), <i>trnS</i> (GCU), <i>trnS</i> (GGA), <i>trnS</i> (UGA), <i>trnT</i> (GGU), <i>trnT</i> (UGU), <i>trnV</i> (GAC), <i>trnV</i> (UAC), <i>trnW</i> (CCA), <i>trnY</i> (GUA)</p> <p>Genes que codifican para polipéptidos</p> <p>Proteínas ribosomales <i>rps2, rps3, rps4, rps7, rps8, rps11, rps12, rps14, rps15, rps16, rps18, rps19</i> <i>rpl2, rpl14, rpl16, rpl20, rpl22, rpl32, rpl33, rpl36</i></p> <p>Genes del aparato de transcripción/traducción <i>rpoA, rpoB, rpoC1, rpoC2, INFA</i></p> <p>Proteínas del aparato fotosintético <i>rbcL</i> <i>psaA, psaB, psaC, psaI, psaJ</i> <i>psbA, psbB, psbC, psbD, psbE, psbF, psbH, psbI, psbJ, psbK, psbL, psbM, psbN, psbT</i> <i>petA, petB, petD, petG, petL, petN</i> <i>atpA, atpB, atpE, atpF, atpH, atpI</i> <i>ycf 3, ycf 4, cemA (ycf 10), ycf 9</i></p> <p>NADH oxidoreductasa <i>ndhA, ndhB, ndhC, ndhD, ndhE, ndhF, ndhG, ndhH, ndhI, ndhJ, ndhK</i></p> <p>Otras proteínas <i>accD, clpP, ccsA (ycf 5)</i></p> <p>Marcos de lectura conservados <i>ycf 1, ycf2, ycf 14 (matK; parcialmente homólogo a intrones maduros)</i></p> <p>Pseudo-genes <i>rpl23, ycf 15</i></p>

La principal fuente de energía para algunos organismos es la luz. Ésta es captada en los cloroplastos y convertida en energía química por un conjunto de proteínas localizadas en las membranas de los tilacoides. La energía química producida se almacena en forma de ATP y poder reductor, que son utilizados para la fijación de carbono y nitrógeno, así como para la biosíntesis de aminoácidos y lípidos. Consecuentemente, la intensidad y disposición de la luz

tienden a producir efectos en el metabolismo de los cloroplastos y por lo tanto, en la expresión genética de los mismos. Estas variables cambian en el curso del día y de un día a otro, por lo que las plantas deben realizar un ajuste dinámico en su expresión genética para lidiar exitosamente con estos cambios.

2.2. Organización de los genes cloroplásticos

Algunos genes plastídicos están organizados en operones complejos que contienen dos, tres y hasta más genes (Ye y Sugiura, 1992). Por lo general, los operones contienen genes que codifican proteínas que participan en cierto proceso bioquímico o vía metabólica, lo cual facilita la regulación de la acumulación estequiométrica de subunidades. Esta organización también ofrece la oportunidad de una regulación diferencial de algunos genes, involucrados tanto en la transcripción como en la traducción. Otros operones contienen genes cuyos productos forman parte de diferentes complejos o participan en diferentes vías metabólicas, por ejemplo, los genes *psbB-psbN-psbH* (subunidades del fotosistema II (PSII)), son transcritos en un mismo pre-mRNA con *petB-petD* (subunidades del citocromo *b₆/f*) (Kohchi *et al.*, 1988).

La transcripción de estos operones es a partir de un promotor, con lo que se sintetiza un pre-mRNA policistrónico que, en la mayoría de los casos, debe ser procesado generando fragmentos de diversos tamaños que contienen los distintos genes que constituyen al operón (Westhoff y Herrmann, 1988; Gruissem *et al.*, 1988; Rymarquis *et al.*, 2006).

Una particularidad importante de algunos de los mRNA plastídicos, es la presencia de una secuencia invertida repetida (IR) localizada en la región 3' no traducida (3'UTR), que se pliega en una estructura tallo-asa (Ruf y Kössel, 1988; Neuhaus *et al.*, 1989). Esta estructura es un elemento regulatorio en *cis*, posee un ΔG de plegamiento muy negativo que podría actuar como una barrera física que impide la actividad de exonucleasas, confiriéndole así gran estabilidad (Barkan *et al.*, 1994).

2.3. Regulación en la expresión genética a nivel post-transcripcional

El primer nivel al cual se regula la expresión de los genes plastídicos es en el inicio de la transcripción, donde la RNA polimerasa cloroplástica reconoce las regiones promotoras localizadas hacia arriba del sitio de inicio de la transcripción. Por ello, la fuerza del promotor puede ser considerada como el primer punto de control de la expresión genética, la cual establece las actividades de transcripción basal de los transcritos (Zurawski y Clegg, 1984). El control transcripcional es un elemento clave en la expresión de los productos génicos del plastidio, sin embargo, los eventos post-transcripcionales juegan un papel importante en la regulación de la expresión de los genes cloroplásticos (Gutiérrez *et al.*, 1999). Estos procesos incluyen edición de RNA, *cis*- y *trans*-splicing, procesamiento de mensajeros policistrónicos y maduración de los extremos 3' y 5' (Monde *et al.*, 2000; Rochaix, 2001).

En experimentos con los genes *psbA* (proteína D1 del fotosistema II), *rbcL* (subunidad grande de la ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa), *atpB/E* (subunidades β y ϵ de la ATP sintasa) y *psaA-psaB* (componentes del fotosistema I), se encontró que la velocidad de transcripción de cada gen es prácticamente la misma durante todas las etapas estudiadas del desarrollo del cloroplasto, mientras que la acumulación de los mRNA varía de manera independiente para cada uno de ellos, lo que significa que los cambios en la transcripción no son suficientes para explicar la acumulación diferencial de sus mRNA (Mullet y Klein, 1987). Esto llevó a proponer que la regulación post-transcripcional es responsable de la diferente acumulación de los mRNA cloroplásticos (Gruissem *et al.*, 1988).

El procesamiento del extremo 3' no traducible de mRNA cloroplásticos es reconocido como un sistema de regulación post-transcripcional importante, en la expresión genética de los cloroplastos. Este proceso se define como la remoción de nucleótidos del extremo 3', provenientes de la terminación deficiente de la transcripción, para producir un transcrito maduro (Deng y Gruissem, 1988; Tonkyn y Gruissem, 1993; Mayfield *et al.*, 1995; Sugita y Sugiura, 1996).

2.4. Participación de factores *trans* en el procesamiento del 3'UTR de mRNA cloroplásticos

La estabilidad de los mRNA no es mediada únicamente por la estructura tallo-asa, ya que la energía libre de formación de esta estructura no correlaciona con su estabilidad *in vitro* ni con la acumulación de sus correspondientes mRNA *in vivo*. Existen evidencias de que esta estructura interacciona con elementos en *trans*, como proteínas de unión a RNA (RNP), que al unirse protegen y alargan la vida media del mensajero (Gruissem *et al.*, 1988; Rott *et al.*, 1998; Nickelsen y Link, 1993, Nakamura *et al.*, 1999). Con base en diversos trabajos realizados en espinaca, se ha propuesto que la formación del extremo 3' maduro de algunos mensajeros cloroplásticos (como *petD*, *psbA*, *rbcL* y *rps14*), implica un corte endonucleolítico adelante del sitio correspondiente al transcrito maduro, seguido por un procesamiento exonucleolítico hasta llegar a una estructura tallo-asa muy estable, la cual parece estar interaccionando con pequeñas proteínas de unión a mRNA (RNP) (Figura 1) (Schuster y Gruissem, 1991; Hayes *et al.*, 1996, Alba y Pagés, 1998).

2.4.1 Proteínas de unión a RNA (RNP)

Las RNP se han encontrado en gran variedad de organismos tales como algas, plantas superiores, *Drosophila melanogaster* y en mamíferos como el ratón y el humano (Fukami *et al.*, 1993). Las RNP son proteínas capaces de reconocer y unirse a mRNA, debido a que poseen regiones conocidas como dominios de unión a RNA (RBD), pueden tener desde uno hasta cuatro dependiendo de la proteína. Cada dominio está formado por aproximadamente 80 residuos de aminoácidos y presenta dos secuencias consenso RNP1: GFGFVTM (octamérica) y RNP2: LFVGNL (hexamérica) (Ni *et al.*, 2000; Nagai, *et al.*, 1995). Estudios de resonancia magnética nuclear (NMR) indican que estos dominios forman una estructura compacta de tipo $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ (Cusack, 1999). La unión de las RNP al RNA ha sido objeto de diversos estudios. Algunas de ellas reconocen la secuencia de RNA a la que se unen, siendo altamente específicas, mientras que otras reconocen estructuras más que secuencias, teniendo un papel más general en el metabolismo del mRNA. Las RNP participan en diversos procesos relacionados con el metabolismo de RNA (para una revisión detallada ver Fedoroff, 2002).

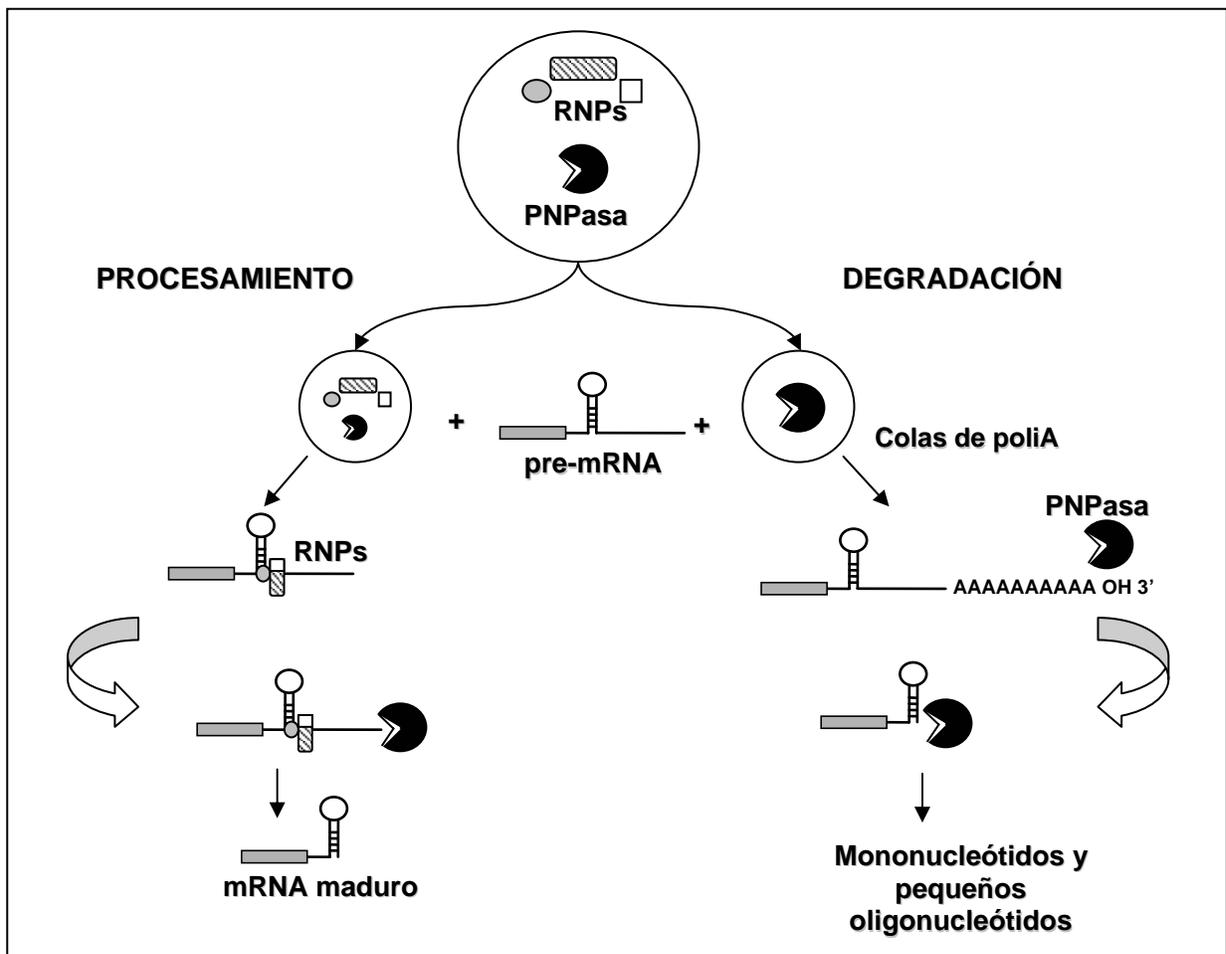


Figura 1. Procesamiento de los 3'UTR de mRNA cloroplásticos y su degradación por acción de la PNPasa. En este modelo las RNP: 24RNP, 28RNP, 55RNP, etc., se unen al mRNA cerca o en la estructura tallo-asa, evitando su degradación por parte de la PNPasa (Modificado de Hayes *et al.*, 1996).

2.4.2. Las RNP de cloroplasto

Estas proteínas se caracterizan porque poseen dos dominios de unión a RNA y algunos motivos auxiliares entre los que destacan un dominio ácido en la región amino (Otha *et al.*, 1995) y otros dominios con zonas ricas en glicina y serina (Ludevid *et al.*, 1992; Otha *et al.*, 1995). Las RNP de cloroplasto (cpRNP) están codificadas por genes nucleares, unicopia, compuestas de cuatro exones y tres intrones, son sintetizadas en el citoplasma y transportadas al cloroplasto debido a la señal de un péptido de tránsito. Este péptido es removido de la proteína al entrar al cloroplasto, generándose así la proteína madura (Smeekens *et al.*, 1990).

Algunas RNP de cloroplasto se han identificado en *Nicotiana tabacum*, espinaca, cebada, mostaza, chícharo, maíz, *Arabidopsis thaliana*, *Chlamydomonas reinhardtii* y otras

(Li y Sugiura, 1990; Danon y Mayfield, 1991; Nickelsen y Link 1993; Mayfield *et al.*, 1995; Freire y Páge, 1995; Otha *et al.*, 1995; Sugita y Sugiura, 1996; Yohn *et al.*, 1996; Kollmus *et al.*, 1996; Horstein *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1991; Hirose y Sugiura, 2001; Fedoroff, 2002) (Tabla 2). En la mayoría de los casos se desconoce su función específica, aunque se les ha relacionado con el metabolismo de RNA.

En tabaco, se han aislado cinco proteínas cpRNP, denominadas CP28, CP29A, CP29B, CP31 y CP33. Las cpRNP de tabaco poseen *in vitro* una alta afinidad por homopolímeros de poli (G), poli (U), DNA de cadena sencilla y doble (Otha *et al.*, 1995). La CP29 de tabaco es una proteína estructuralmente similar a la 28RNP de espinaca; se ha demostrado que tanto ella como la CP31 interactúan con pre-tRNA y participan en la regulación del procesamiento de los extremos 3'UTR (Nakamura *et al.*, 1999).

La 28RNP fue la primera proteína purificada de cloroplastos de espinaca, en experimentos donde se inmunosubstraía esta proteína del extracto de procesamiento de RNA de cloroplastos se observaron alteraciones en el correcto procesamiento *in vitro* de al menos cuatro diferentes mRNA (*rbcL*, *psbA*, *petD* y *rps14*), lo que sugirió fuertemente que la 28RNP era esencial para el correcto procesamiento de los extremos 3'UTR *in vitro* (Schuster y Gruissem, 1991). La 28RNP reconoce motivos estructurales más que secuencias específicas, posee una afinidad mayor por moléculas de RNA que contengan la estructura tallo-asa y no posee actividad de nucleasa (Schuster y Gruissem, 1991; Lisitsky y Schuster, 1995).

En espinaca, se ha demostrado que una proteína de 24 kDa, la 24RNP, se une a los 3'UTR de los mensajeros cloroplásticos *petD*, *psbA* y *rbcL*. Esta proteína ha sido identificada dentro de un extracto proteico de cloroplastos de espinaca, que es capaz de llevar a cabo el procesamiento del extremo 3' *in vitro*. La comparación de las secuencias de aminoácidos de la 24RNP y la 28RNP muestra un 57% de identidad (Toledo-Ortiz, 1998). Al igual que la 28RNP, la 24 RNP es una proteína ancilar que se encuentra asociada a un complejo de alto peso molecular (high molecular weight complex, HMWC) que posee actividad de polinucleótido fosforilasa (PNPasa) (Hayes *et al.*, 1996). Esta proteína de 100 kDa es homóloga a la PNPasa de *Escherichia coli*, la cual es una exo-ribonucleasa 3'-5' que degrada RNA a nucleósidos difosfato de una manera procesiva (Littauer y Soreq, 1982).

También se encontró que al remover del HMWC la 28RNP y 24RNP no era posible que éste procesara correctamente el extremo del 3' de *petD*, sin embargo, cuando a una

fracción de este mismo HMWC, se le adicionaba una fracción que contenía solo estas dos proteínas, se vio restaurado el correcto procesamiento del 3'UTR, observándose que estas proteínas pueden tener un papel en la regulación del procesamiento y estabilidad del extremo 3' (Hayes *et al.*, 1996). La caracterización posterior del HMWC, mostró que está constituido por un homo-multímero de PNPasa (Baginsky *et al.*, 2001). Sin embargo, este complejo purificado muestra una actividad degradativa del RNA y no de procesamiento del 3'UTR; lo cual podría deberse a la ausencia de las RNP asociadas a este complejo (Loza-Tavera *et al.*, 2006).

Se ha demostrado que tanto la 28RNP (Lisitsky y Schuster, 1995) como la 24RNP (Loza-Tavera *et al.*, 2006) pueden ser fosforiladas *in vitro* por cinasas heterólogas. Esta modificación altera su unión a RNA, lo que sugiere que la fosforilación puede ser un mecanismo para regular el procesamiento de los mRNA a los que se unen.

En *Chlamydomonas reinhardtii* se ha encontrado que la traducción del mRNA del gen *psbA* es activada por la unión de un complejo proteico al 5'UTR. El complejo está constituido por las proteínas de unión a RNA: RB38, RB47, RB55 y RB60; donde RB47 es requerida para el inicio de la traducción. Esta proteína es quien interactúa directa y específicamente con el 5'UTR, sin embargo, necesita de RB60 que es una disulfuro isomerasa, para unirse al 5'UTR de *psbA* (Levitan *et al.*, 2005). La estabilidad de los mRNA también depende de la capacidad de los ribosomas para asociarse con el complejo RNA-proteínas (Danon y Mayfield., 1991; Mayfield *et al.*, 1995; Yohn *et al.*, 1998).

2.5. Arabidopsis thaliana

A. thaliana ha llegado a ser uno de los más importantes sistemas para el estudio de muchos procesos bioquímicos y genéticos en plantas (Fig. 2). Sus características únicas ofrecen una serie de ventajas para considerarla como modelo de investigación. En primer lugar, es un verdadero diploide con un ciclo de vida muy corto (6-8 semanas), de fecundación autógena y produce numerosas semillas que permanecen viables durante muchos años. Su rápido crecimiento y talla pequeña permiten el análisis de un gran número de individuos en un espacio mínimo y por lo tanto, la consiguiente amplificación rápida de los genotipos útiles para estudios posteriores.

Tabla 2. Características y funciones de RNPs de cloroplastos de plantas superiores.

PROTEÍNA	NOMBRE	FUNCIÓN	CITAS
CP28, CP29A, CP29B, CP31, CP33	<i>Nicotiana tabacum</i>	Unión preferencial a poli (G), poli (U), proteínas de unión generalizada a RNA, presentes como complejos de 20-30S. La cp31 participa en edición de mRNA cloroplásticos.	Li y Sugiura., 1990; Li y Sugiura, 1991; Li <i>et al.</i> , Sugiura, 1991; Ye y Sugiura, 1991; Ye <i>et al.</i> , 1992; Nakamura <i>et al.</i> , 2003.
CP-RNP30, CP-RNP31	<i>N. plumbaginifolia</i>	Corresponden a las cp29A y cp29B de <i>N. tabacum</i> .	Otha <i>et al.</i> , 1995.
CP29, CP31, CP33	<i>A. thaliana</i>		Ohta <i>et al.</i> , 1995; Sugita y Sugiura, 1996; Lorkovic y Barta, 2002.
RNP-T	<i>A. thaliana</i>		Bar-Zvi <i>et al.</i> , 1992.
ATRBP31, 33	<i>A. thaliana</i>		Chen <i>et al.</i> , 1994 ; Reddy <i>et al.</i> , 2001.
CRBP	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>		Rong <i>et al.</i> , 1994.
28RNP	<i>Spinacia oleracea</i>	Regulación en el procesamiento y estabilidad del extremo 3'UTR.	Schuster y Gruissem, 1991; Lisitsky <i>et al.</i> , 1994; Lisitsky y Schuster, 1995.
24RNP	<i>S. oleracea</i>	Regulación en el procesamiento y estabilidad del extremo 3'UTR.	Schuster y Gruissem, 1991, Abrahamson, no publicado, Toledo- Ortiz, 1998.
RNP1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Proteína de unión a AG-1; unión específica a secuencias sencillas ricas en U.	Li y Sugiura, 1990; Reddy <i>et al.</i> , 2001.

En segundo lugar, su genoma compacto, con relativamente escasas secuencias repetidas y un bajo contenido en DNA (aproximadamente 70 Mpb por núcleo haploide, unas 25 veces el tamaño del genoma de *E. coli*), la hacen la planta superior de genoma más pequeño conocido, y por lo tanto, un sistema ideal para estudios genéticos y moleculares. En tercer lugar, puede ser transformada por el plásmido Ti en *Agrobacterium tumefaciens*, donde es posible introducir éste plásmido con los genes de interés y mantenerlos en forma estable, además puede transformarse fácilmente por infiltración de DNA por vacío en los botones florales para obtener embriones transformados (Rodríguez López, 2004). Finalmente, varios grupos de investigación están desarrollando mapas físicos de su genoma y correlacionándolos con los mapas genéticos ya disponibles.

En el genoma de *A. thaliana* se han identificado diez proteínas de la familia de las RNP, que presentan un péptido de tránsito, lo cual las hace candidatas a tener una localización cloroplástica, aunque también podría ser mitocondrial. Estas secuencias son: la AT1G60000, AT1G01080, AT2G37220, AT2G35410, AT3G52150, CP29, CP31 (RBP31), CP33, AT4G09040 y AT5G50250 (Bar-Zvi *et al.*, 1992; Reddy *et al.*, 2001; Ohta *et al.*, 1995; Sugita y Sugiura, 1996; Lorkovic y Barta, 2002). Tres de estos genes, *cp29*, *cp31* y *cp33*, codifican proteínas homólogas a las cpRNP de *N. plumbaginifolia* (Ohta *et al.*, 1995), sus cDNAs y sus genes fueron aislados empleando como sondas cDNA de tabaco que codifica a las proteínas CP29, CP31 y CP33.

La CP29 es un polipéptido de 334 aminoácidos (a.a.), entre cuyos primeros 66 a.a. abundan la serina y la treonina, confiriéndole una carga neta positiva característica de los péptidos de tránsito (Smeekens y Robinson, 1990). La proteína madura posee 268 a.a. y una masa de 28.3 kDa. Los primeros 32 a.a. de la proteína madura son ricos en ácidos glutámico y aspártico (DA). Entre los dos dominios consenso de unión a RNA (CS-RBD I y II) presenta una zona espaciadora rica en glicina y serina, siendo así muy parecida a la CP29 de tabaco. La CP31 posee 314 a.a., de los cuales 76 corresponden al péptido de tránsito, la proteína madura de 238 a.a. tiene una masa molecular aproximada de 26.3 kDa. La secuencia del péptido maduro tiene un 62% de identidad con la proteína CP31 de tabaco; el dominio ácido es similar al de la proteína 28RNP de espinaca (43% de identidad). Entre los dos dominios de unión a RNA posee una zona espaciadora pequeña (Ohta *et al.*, 1995). La CP33 es un polipéptido que tiene 321 a.a. con un péptido de tránsito de 73 a.a., por lo que la proteína madura consiste en 256 a.a. y presenta una masa molecular de 27.8 kDa; la región espaciadora de esta proteína es similar a la de la CP31 (Ohta *et al.*, 1995).

Otras proteínas involucradas en la expresión genética de los mensajeros cloroplásticos son proteínas con motivos TPR (tetratricopéptido) y PPR (pentatricopéptido). El motivo TPR está constituido por 34 aminoácidos, presente de 1 a 19 veces en la secuencia de estas proteínas, siendo muy semejante al dominio PPR (Nakamura *et al.*, 2003).



Figura 2. *Arabidopsis thaliana*.

En una mutante no fotosintética de *A. thaliana*, se encontró que la proteína HCF152 se encuentra involucrada en el procesamiento de mensajeros cloroplásticos policistrónicos, como *psbB-psbT-psbH-petB-petD*. Esta proteína codificada en el núcleo, está constituida por 12 motivos PPR, que es una característica que poseen las proteínas con repeticiones de pentatricopéptidos (PPR). La HCF152 es una proteína de unión a RNA que posee una alta afinidad por los mensajeros cloroplásticos, se encuentra también implicada en el procesamiento y estabilización de *petB* (Nakamura *et al.*, 2003).

Arabidopsis thaliana es un modelo genético importante, como anteriormente se ha dicho, es uno de los pocos organismos en los que se conoce la secuencia completa de su genoma, y es factible de ser transformado, por lo que se pueden generar mutantes carentes de algunas RNP, que ayudarían en determinar la función de estas proteínas y así realizar la caracterización bioquímica del procesamiento de los 3'UTR de mensajeros cloroplásticos.

3. HIPÓTESIS

Si *A. thaliana* y espinaca están filogenéticamente relacionadas, entonces podrían compartir tanto un juego de proteínas que conforman los extractos con actividad de procesamiento como con un mecanismo bioquímico del procesamiento de los extremos 3'UTR semejantes.

4. OBJETIVO GENERAL

Obtener y caracterizar un extracto proteico de cloroplastos de *Arabidopsis thaliana* capaz de procesar el 3' UTR de mRNA cloroplásticos *in vitro*.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Clonar los extremos 3'UTR de los genes que codifican para *psbA*, *petD* y *rbcL* de *Arabidopsis thaliana* y *rbcL* de espinaca.
2. Purificar a partir de cloroplastos intactos de *Arabidopsis thaliana* un extracto proteico con capacidad de procesar el extremo 3'UTR de mRNA cloroplásticos.
3. Determinar el número y los tamaños de las proteínas que se unen a los 3'UTR de los genes *psbA*, *petD* y *rbcL* en el EP de cloroplastos de *Arabidopsis thaliana*.
4. Caracterizar el patrón de procesamiento *in vitro* de los 3'UTR por el EP de cloroplastos de *Arabidopsis thaliana* y compararlo con el de espinaca.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

- I. Para lograr el primer objetivo se cultivaron plantas de *A. thaliana* bajo un fotoperíodo de día corto (6 h luz/18 h oscuridad) por 8 semanas (Hernández Navarro, 2000). Posteriormente se realizó la purificación de cloroplastos intactos empleando gradientes discontinuos de Percoll (40-80%). Los cloroplastos fueron lisados para realizar la purificación del EP. Este extracto se preparó precipitando con sulfato de amonio (25%), eliminando los ácidos nucleicos con una resina Sephacel DEAE y precipitando nuevamente con sulfato de amonio al 56.5%, para finalmente dializar el EP.
- II. Posteriormente fue necesario clonar los extremos 3'UTR de los genes *psbA* (codifica la subunidad D1 del fotosistema II), *petD* (codifica la subunidad IV del citocromo b6/f) y *rbcL* (codifica la subunidad grande de la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa) de *A. thaliana* y *rbcL* de espinaca, bajo el control de un promotor reconocido por la RNA polimerasa T7 y la RNA polimerasa SP6 en presencia de [$\alpha^{32}\text{P}$]-UTP rNTPs. Para ello se diseñaron *primers* específicos para cada segmento y se empleó la reacción de PCR para amplificar estas regiones a partir de DNA total extraído de las plantas indicadas.
- III. Para la síntesis de los 3'UTR se realizaron transcripciones *in vitro* con T7 o SP6 RNA polimerasa y NTP, de los vectores que contenían a los extremos 3'UTR de los genes *psbA*, *petD*, *rbcL* tanto de *A. thaliana* como de espinaca (los 3'UTR de *psbA* y *petD* de espinaca habían sido clonados previamente en nuestro laboratorio; Arenas Huertero, 2002). La reacción incluía nucleótidos marcados radiactivamente con [$\alpha^{32}\text{P}$]-UTP.
- IV. Se realizaron ensayos de procesamiento *in vitro*, empleando todos los 3'UTR radiactivos y los EP de *A. thaliana* y espinaca. Para el análisis de los productos procesados se emplearon geles desnaturalizantes de poliacrilamida-urea y autoradiografía.
- V. Los ensayos de reconocimiento de proteínas que unen los extremos 3'UTR se realizaron en una reacción de entrecruzamiento con luz ultravioleta (X-UV), en la que se tenía cada uno de los 3'UTR radioactivos y uno de los EP, ya fuera de *A. thaliana* o de espinaca.

FASES EXPERIMENTALES DEL TRABAJO

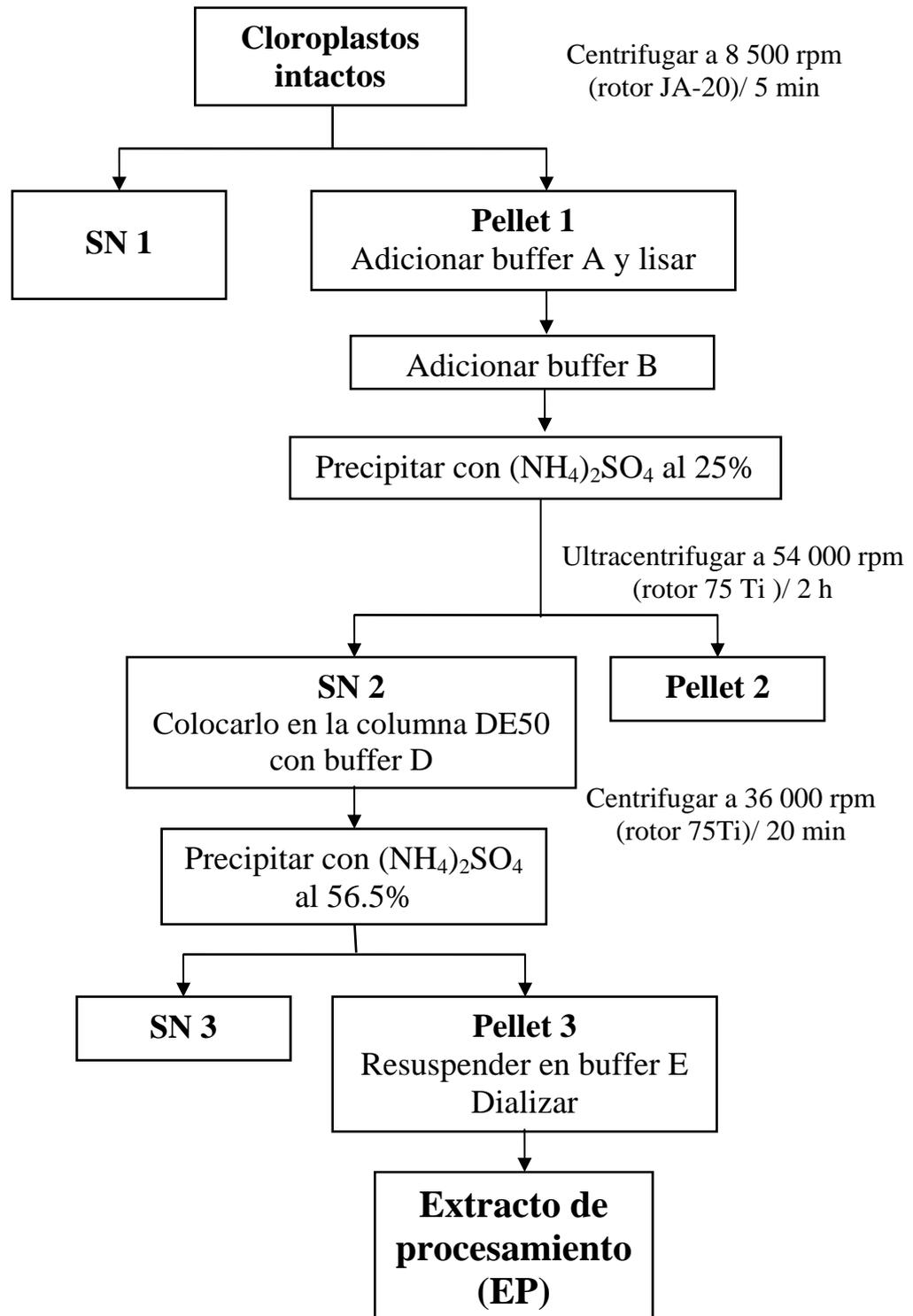
Caracterización de un extracto proteico de *A. thaliana* que procesa 3' UTRs *in vitro*

Purificación del extracto protéico

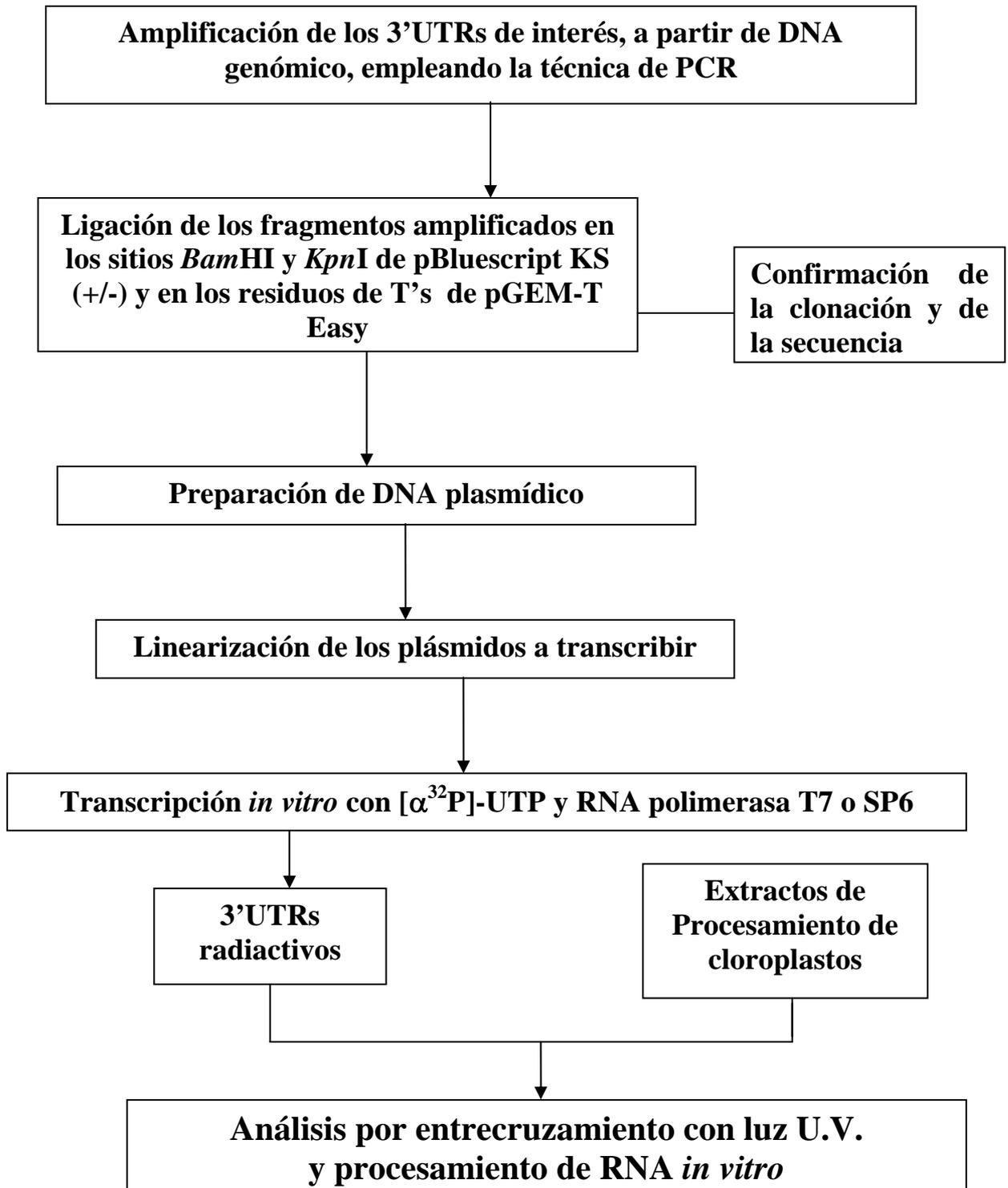
Síntesis de los 3'UTRs radiactivos

**Procesamiento de 3'UTRs *in vitro*
Entrecruzamiento con luz UV**

Purificación del extracto de procesamiento de RNA de cloroplastos de *A. thaliana* (Gruissem y Schuster, 1991)



Clonación de extremos 3'UTRs de mRNA de cloroplastos, análisis de proteínas presentes en el extracto de cloroplastos y procesamiento de 3'UTRs *in vitro* (Sambrook et al., 1989)



6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Cultivo de *Arabidopsis thaliana*

A. thaliana es una planta de la familia de las crucíferas, que presenta un tamaño aproximado entre 10 y 20 cm de altura, consta de una roseta de hojas pequeñas, con una inflorescencia que se genera en la parte central de la planta. La inflorescencia es un racimo que contiene una serie de flores que constan de cuatro sépalos rodeando y alternando con cuatro pétalos blancos. Normalmente existe autofecundación. Después de fertilizado, el ovario se alarga y desarrolla un fruto llamado silicua, cada silicua contiene de 30 a 60 semillas. Las semillas son pequeñas, con un peso aproximado de 20 μg c/u. Las características de *A. thaliana*, tales como el tamaño, la capacidad de cultivar un gran número de organismos en un espacio pequeño, el tiempo generacional corto, la gran cantidad de semilla, el rápido crecimiento y la autofecundación, hacen de esta planta un excelente modelo para estudios genéticos. *A. thaliana* es una especie que responde a fotoperíodo, en día largo florece (Meyerowitz, 1987). Dado que en nuestro trabajo requeríamos hojas, la planta fue cultivada bajo fotoperíodo de día corto obteniendo gran cantidad de hojas en períodos largos de tiempo, hasta ocho semanas, sin llegar a presentar floración (Fig. 3).



Figura 3. Cultivo de *A. thaliana*. Las plantas fueron cultivadas durante ocho semanas bajo fotoperíodo de día corto (8 h de luz y 16 h de oscuridad) en una cámara de crecimiento Mod. AR-32L (Percival Scientific, EUA), a una temperatura de 22 °C \pm 2°C.

Procedimiento para la siembra

1. Pesar 0.1 g de semillas (equivalente a 4545 semillas).
2. Colocar las semillas en 26 mL de una solución de agarosa al 0.05%, mezclar y almacenar a 4 °C durante toda la noche.
3. Sembrar las semillas (24 h después, como máximo) en macetas conteniendo suelo METROMIX 250 como sustrato. Las macetas se colocan en charolas cubiertas con tapas de plástico transparente. Se cultivan en una cámara de crecimiento (Mod. AR-32L, Percival Scientific, EUA) bajo un fotoperíodo de día corto (8 h de luz y 16 h de oscuridad) a una temperatura de 22 °C ± 2°C.
4. Regar las macetas tres veces por semana con agua y una vez cada 15 días con solución de Hoagland (Ver composición en el Apéndice).
5. Después de dos días, entreabrir la tapa sin retirarla. Después de 2 semanas, retirar la tapa cerciorándose de que toda el agua que había en ella se haya evaporado. Cosechar después de seis semanas.

6.2. Clonación de los 3'UTR de los genes cloroplásticos *psbA*, *petD* y *rbcL* de *Arabidopsis thaliana* y *rbcL* de espinaca

6.2.1. Extracción de DNA genómico de *A. thaliana*

A. thaliana se ha utilizado muy ampliamente por el tamaño pequeño de su genoma (Smith, 1997) y la plasticidad que tiene para estudios fisiológicos. Las células de plantas son muy ricas en nucleasas, por lo que, para reducir dicha actividad, la obtención de DNA genómico se realiza con un amortiguador de extracción que contenga grandes cantidades de EDTA y un detergente. Los polisacáridos y restos fenólicos son un problema común en la purificación de DNA, por lo que se recomienda el uso de un amortiguador que contenga Tris, EDTA y gran cantidad de NaCl. Tomando en cuenta estas consideraciones la cantidad de DNA genómico que se extrae es aceptable (Sambrook *et al.*, 1989). En base a estas generalidades se hizo el protocolo siguiente.

Soluciones

Amortiguador de extracción 1X		(500 mL)
1 M	Tris [pH 8.0]	50 mL de 1 M
0.5 M	EDTA [pH 8.0]	50 mL de 0.5 M
500 mM	NaCl	14.51 g
	β -Mercaptoetanol	10 μ L

Procedimiento

1. Triturar 1 g de tejido de hojas y tallos con N₂ líquido hasta pulverizarlo.
2. Transferir el tejido a un tubo Falcon de 50 mL y adicionar 15 mL del amortiguador de extracción.
3. Adicionar 2 mL de SDS al 10%, mezclar con agitación. Incubar 10 min a 65°C.
4. Adicionar 5 mL de acetato de potasio 5M [pH 4.8] y agitar. Incubar a 20 min a 0°C.
5. Centrifugar a 14,500 rpm por 20 min. Filtrar el sobrenadante (SN) con gasas estériles, colectándolo en un tubo que contenga 10 mL de isopropanol.
6. Incubar a -20°C por 30 min.
7. Centrifugar a 13,000 rpm por 15 min. Desechar el SN e invertir los tubos sobre un papel absorbente para eliminar el exceso de isopropanol.
8. Resuspender la pastilla en 700 μ L de Tris (50 mM) y EDTA (10 mM) [pH 8.0]. Agregar 3 μ L de RNAsa A (No. de catálogo 109 169, Roche, EUA) e incubar por 30 min a 37 °C.
9. Centrifugar a 14,000 rpm por 10 min. Transferir el SN a tubos Eppendorf y adicionar un volumen igual de fenol (saturado con amortiguador de fosfatos pH 7.0) /cloroformo/alcohol isoamílico (25:25:1). Mezclar por inversión.
10. Centrifugar a 14,000 rpm por 15 min. Transferir la fase acuosa a tubos Eppendorf.
11. Adicionar 1/10 del volumen total de acetato de sodio 3 M (75 μ L) y 500 μ L de isopropanol. Incubar 30 min a -20°C.
12. Centrifugar a 14,000 rpm por 10 min. Lavar la pastilla con 1 mL de etanol al 70%, desechar el SN y secar la pastilla.
13. Resuspender la pastilla en 100 μ L de Tris (10 mM) [pH 8.0] y EDTA (1 mM).

6.2.2. PCR y clonación

Los oligonucleótidos que permitieron amplificar los extremos 3'UTR de los genes, *psbA* (At3'psbA), *petD* (At3'petD), *rbcL* (At3'rbcL) de *A. thaliana* y *rbcL* (So3'rbcL) de espinaca, se diseñaron con el programa Primer 3'Output. Las secuencias de los oligonucleótidos se muestran en la Tabla 3. Algunos de los iniciadores fueron diseñados con sitios de restricción para ser clonados inicialmente en el vector pBluescript KS (+/-), sin embargo, sólo se logró con At3'rbcL. Las PCRs se realizaron utilizando DNA total como molde.

Después de hacer varias reacciones modificando la temperatura y la concentración de MgCl₂, se eligieron las condiciones que proporcionan un alto rendimiento en la amplificación de un solo producto. El producto amplificado para At3'rbcL, se ligó (después de ser restringido y purificado) a pBluescript KS (+/-) en los sitios *Bam*HI y *Kpn*I (Ver Apéndice). Los otros productos (At3'psbA, At3'petD y So3'rbcL) se clonaron en el sistema pGEM T-Easy, donde las colas de adeninas de los productos amplificados se unen por complementariedad con las timinas que este vector posee artificialmente en sus extremos (Ver Apéndice).

Después de la reacción de ligación se comprobó la presencia de los fragmentos clonados, realizando una doble digestión con las enzimas *Kpn*I y *Bam*HI en el caso de At3'rbcL clonado en pBluescript o con *Bst*ZI para los insertos clonados en el vector pGEM T-Easy. Los fragmentos clonados se secuenciaron para confirmar su integridad, en el Instituto de Fisiología Celular y en el Instituto de Biotecnología, UNAM. Para ello, se emplearon los iniciadores T3 (5'-ATTAACCCTCACTAAAGGGA-3') y T7 (5'-TAATACGACTC ACTATAGGG-3').

Procedimiento

1. Preparar la mezcla de reacción de PCR, a fin de tener un volumen final de 25 µL, conteniendo lo siguiente: MgCl₂ 1.5 mM; mezcla de dCTP, dATP, dGTP y dTTP (dNTPs) (Promega, EUA) 100 mM, iniciadores FP y RP 25 pmoles de cada uno por reacción (ver Tabla 3); Taq DNA polimerasa 1U (Invitrogen, EUA); amortiguador de la enzima 1X y DNA total (10 ng/µL) 3.0 µL.

2. Colocar la mezcla de reacción en un termociclador (Omn-E thermal cycler, Labnet, Reino Unido) y amplificar la secuencia deseada utilizando un ciclo con desnaturalización de 94 °C por 5 min; 30 ciclos de amplificación de 94 °C por 1 min, temperatura de apareamiento por 1 min y extensión a 72 °C por 1 min, para finalizar con un ciclo de extensión de 72 °C por 5 min. Las temperaturas de apareamiento empleadas para cada fragmento a amplificar se indican en la Tabla 4.
3. Después de confirmar en un gel de agarosa que se habían amplificado los productos de los tamaños esperados, éstos fueron purificados de la mezcla de reacción de PCR, empleando el sistema QIAQuik (QIAGEN, EUA), de acuerdo a las instrucciones del producto.
4. Para el caso de At3'rbcl, los productos de PCR y el plásmido pBluescript II KS (+/-) (Stratagene, EUA) fueron digeridos con las enzimas *KpnI* y *BamHI* (Ver protocolo de reacción de restricción en el Apéndice), purificados con fenol-cloroformo (Ver protocolo de purificación de DNA por fenol-cloroformo en el Apéndice) y empleados para la ligación.
5. La ligación se llevó a cabo adicionando en un tubo Eppendorf 2.6 µL (50 ng) de pBluescript KS (+/-), 3.2 µL de producto de PCR At3'rbcl (procurando tener una relación de vector: inserto de 1:3), 1 µL de amortiguador 10X, 2 µL de ATP 10 mM, 10 U de la T4 DNA ligasa y agua c.b.p. 10 µL. Incubar a temperatura ambiente por 1.5 h.
6. Para las ligaciones de At3'psbA, At3'petD y So3'rbcl, adicionar 1.0 µL (50 ng) de pGEM-T Easy (Promega, EUA), 1.3 µL de los productos de PCR (sin tratamiento previo, directamente de la reacción de PCR), 5 µL de amortiguador 2X y 3 U de la T4 DNA ligasa (procurando tener una relación de vector: inserto de 1:3). El volumen final de la reacción debe ser de 10 µL. Incubar a temperatura ambiente por 1.5 h.
7. Preparar células de *E. coli* XL-1 Blue competentes, empleando el método de cloruro de rubidio (Ver protocolo en el Apéndice).
8. En el caso de los productos clonados en pGEM-T-Easy, la transformación se realiza en un tubo Eppendorf de 1.5 mL donde se colocaran 50 µL de células competentes XL1-Blue y 2.0 µL de la reacción de ligación. Para los productos clonados en pBluescript KS (+/-) (At3'rbcl) se emplearon 10 µL de la reacción de ligación (Ver protocolo de

transformación genética).

9. Las colonias que posean los insertos son seleccionadas por α -complementación, es decir, escogiendo colonias blancas que debido a la presencia del inserto, no son capaces de producir la región amino de la proteína β -galactosidasa, por lo que no pueden romper el sustrato cromogénico X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -galactósido), el cual otorga una coloración azul a las colonias de las bacterias capaces de romperlo (Ullmann *et al.*, 1967; Sambrook *et al.*, 1989).
10. Cultivar algunas colonias seleccionadas en 5 mL de medio LB suplementado con ampicilina y tetraciclina. Extraer DNA con el kit QIAprep (QIAGEN, EUA).
11. Verificar la presencia de los insertos clonados, realizando digestiones dobles con las enzimas *KpnI/BamHI* para At3' rbcL y con *BstZI* para At3' psbA, At3' petD y So3' rbcL. Se utilizó *BstZI* ya que pGEM-T-Easy cuenta con dos de estos sitios en su MCS flanqueando el sitio de inserción del fragmento clonado, no se utilizó *EcoRI* (que es una enzima más común), ya que algunos insertos tenían dentro de su secuencia este sitio de restricción, además de que se contaba con *BstZI* en el laboratorio.

Tabla 3. Secuencia de iniciadores utilizados. La secuencia subrayada en negritas corresponde a los sitios de restricción de la enzima *KpnI* y las secuencias subrayadas en cursivas corresponden al sitio *BamHI* presentes en algunos iniciadores. FP, iniciador *forward*, RP, iniciador *reverse*.

VECTOR	OLIGO-NUCLEÓTIDOS	TM (°C)	SECUENCIA (5'-3')	SITIOS DE CLONACIÓN
pGEM-T Easy	FP-At3'psbA	60.5	AT <u>GGTACC</u> TGCTGTTGAGGCTCCATCTA	Timinas 3' terminales
	RP-At3'psbA	60.5	AT <u>GGATCC</u> ATCCGCCCTACGCTACTAT	
pGEM-T Easy	FP-At3'petD	58.5	TGGAGCAACATTACCGATTG	Timinas 3' terminales
	RP-At3'petD	58.5	TTTCCAGTCGAACCCATTTT	
pBSKS(±)	FP-At3' rbcL	58	AT <u>GGTACC</u> TGCTGCTTGTG	<i>BamHI/</i> <i>KpnI</i>
	RP-At3' rbcL	58	AT <u>GGATCC</u> GTTCCTTCGCTTA	
pGEM-T Easy	FP-So3' rbcL	60	<u>GGATCC</u> GGAACGAAAAGGGACAATATACAG	Timinas 3' terminales
	RP-So3' rbcL	60	<u>GGTACC</u> TGCTGCTTGTGAAGTATGGAA	

Tabla 4. Condiciones de amplificación de los 3'UTRs.

Etapa	Número de ciclos	Fragmento amplificado			
		At3'psbA	At3'petD	At3'rbcl	So3'rbcl
Desnaturalización	1	94 ° C / 5 min			
Desnaturalización	30	94 ° C / 1 min			
Apareamiento		60.5 ° C 1 min	58.5 ° C 1 min	58 ° C 1 min	60 ° C 1 min
Extensión		72 ° C / 1 min			
Extensión final	1	72 ° C / 5 min			

6.3. Extracción y purificación del extracto de procesamiento de extremos 3'UTR de cloroplasto de *A. thaliana*

6.3.1. Aislamiento de cloroplastos y preparación de extractos de procesamiento de RNA de *A. thaliana* (Gruissem y Schuster, 1991).

Los extractos crudos proteicos purificados parcialmente de cloroplastos han sido herramientas importantes en el estudio de factores que intervienen en la regulación transcripcional de genes nucleares y cloroplásticos. En algunas plantas se ha llevado a cabo dicho fraccionamiento y los extractos proteicos obtenidos se han empleado en la determinación estructural de promotores plásticos y en el procesamiento de precursores de tRNA. Estos extractos son utilizados en el análisis del procesamiento de mRNA cloroplástico (Gruissem, 1989).

Soluciones

Amortiguador de extracción AGB 1X (1 L)

20	mM Tricina [pH 8.4]	3.58 g
0.45	mM Sorbitol	81.99 g
10	mM EDTA	3.72 g
10	mM NaHCO ₃ (10 mL de 1 M)	0.84 g

0.1% BSA 1.00 g

El NaHCO₃ y el BSA deben agregarse un poco antes de usar el buffer.

Amortiguador de resuspensión ARB 5X (1 L)

20 mM HEPES [pH 7.4]	23.83 g
0.3 M Sorbitol	273.30 g
5 mM MgCl ₂	5.08 g
2.5 mM EDTA	4.65 g
10 mM NaHCO ₃ (2.5 mL de 1 M para 50 mL de 5 X)	4.2 g
0.1% BSA	5.0 g

Stock de NaHCO₃ (20 mL)

1 M NaHCO₃ [pH 7.8] 1.68 g

Gradientes de Percoll

Solución de Percoll (80 mL)

95% Percoll w/v	67.2 mL
3% PEG 6000	2.4 g
1% Ficoll	0.8 g
1% BSA	0.8 g
H ₂ O c.b.p.	80 mL

Gradiente 80% (para 1 tubo de centrifuga de 50 mL)

Solución de Percoll	7.65 mL
Amortiguador ARB 1X	1.35 mL

Gradiente 40% (para 1 tubo de centrifuga de 50 mL)

Solución de Percoll	8.82 mL
Amortiguador ARB 1X	12.18 mL

Amortiguador A (250 mL)

10 mM Tris [pH 7.9]	2.50 mL de 1M
1 mM EDTA	1.25 mL de 0.2 M
5 mM DTT	1.25 mL de 1 M (agregar después de esterilizar por autoclave)
H ₂ O c.b.p.	250 mL

Amortiguador B (250 mL)

50 mM Tris [pH 7.9]	12.5 mL de 1 M
10 mM MgCl ₂	2.5 mL de 1 M
2 mM DTT	0.5 mL de 1 M
25% Sacarosa	62.5 g
50% Glicerol v/v	125 mL
H ₂ O c.b.p.	250 mL

Nota: El DTT se agrega después de que la solución se ha esterilizado por autoclave, un poco antes de usarse.

Solución C

(NH ₄) ₂ SO ₄ (saturado)	250 mL
--	--------

Amortiguador D (250 mL, cromatografía Sephacel-DEAE, Amesham)

Amortiguador A	100 mL
Amortiguador B	100 mL
(NH ₄) ₂ SO ₄ (saturado)	30 mL
1 M DTT	700 µL
H ₂ O c.b.p.	250 mL

Amortiguador E (2 L)

20 mM HEPES [pH 7.9]	40 mL de 1M
60 mM KCl	60 mL de 2 M
12.5 mM MgCl ₂	25 mL de 1 M
0.1 mM EDTA	1 mL de 0.2 M

2.0 mM DTT	4 mL de 1 M (agregar después de esterilizar por autoclave)
5% Glicerol v/v	100 mL
H ₂ O c.b.p.	2 L

Nota: El amortiguador AGB puede prepararse con agua desionizada estéril. Todas las demás soluciones deben prepararse con agua desionizada tratada con DEPC y posteriormente esterilizarse. Asimismo, el material de cristalería debe ser esterilizado en autoclave. Todos los pasos deben realizarse a 4°C y con soluciones y equipo preenfriados.

Procedimiento

1. Cosechar la hojas de *A. thaliana* que habían sido mantenidas en oscuridad por 24 h (para quitar el almidón). Cortar solo láminas foliares eliminando los pecíolos.
2. Colocar las hojas en agua fría tratando de mantenerlas sumergidas.
3. Enjuagar (tratando de eliminar todas las partículas sólidas: suelo, fertilizante, etc.), secar y pesar el tejido.
4. Homogeneizar una porción en la licuadora (aprox. 30 g de tejido en 180 mL de AGB). Dar tres pulsos de un segundo a baja velocidad para distribuir y picar el tejido. Después dar tres pulsos de 1 s a alta velocidad para homogeneizar.
5. Filtrar en dos capas de gasa en un vaso de precipitados.
6. Permitir que la primera porción se filtre mientras se muele la segunda porción y así sucesivamente. Drenar y exprimir todo el líquido posible. Repetir cuantas veces sea necesario. Separar una alícuota homogénea para medir proteína (extracto de hoja de *A. thaliana*).
7. Centrifugar en cuatro tubos para centrífuga de 50 mL de plástico opaco a 8000 rpm en una centrífuga (Mod. RC5C-Plus, Sorvall, EUA) en el rotor JA-20 (ángulo fijo) por 5 min a 4°C. Para no perder muchos cloroplastos de la pastilla se recomienda decantar el SN lentamente para evitar que se venga parte de la pastilla. Repetir las veces que sean necesarias. Al final de las centrifugaciones quitar el SN con una pipeta Pasteur para evitar que la pastilla se despegue.
8. Resuspender las pastillas con un pincel agregando 5 mL de amortiguador ARB o lo mínimo necesario para que no queden grumos. Hacerlo suavemente y deshacer todos los

grumos ya que afectan el gradiente.

9. Cargar las pastillas resuspendidas en cuatro tubos de centrifuga transparentes de 50 mL, en los que previamente se había preparado un gradiente discontinuo con 21 mL de Percoll al 40% en ARB 1X (arriba) y 9.0 mL de Percoll al 80% en ARB 1X (abajo). Estos gradientes se preparan agregando primero 21 mL de la mezcla de 40% de Percoll empleando una jeringa con aguja y después con una pipeta Pasteur, colocando la punta hasta el fondo, se agrega la fracción de 80%, muy lentamente para evitar que se mezclen las soluciones ó que se formen burbujas. Se debe observar la formación de una interfase.
10. Centrifugar nuevamente en un rotor de ángulo fijo (JA-20) a 7,000 rpm a 4°C por 20 min, sin freno para que el rotor se pare lentamente.
11. Aparecerán dos bandas que corresponden a los cloroplastos. La banda superior (en la parte superior de 40%) son cloroplastos rotos, la inferior (en la interfase 40-80) son cloroplastos intactos. Colectar la banda inferior con una pipeta Pasteur. Juntar todos los cloroplastos intactos en un solo tubo limpio.
12. Diluir los cloroplastos en ARB 1X (aprox. 2 volúmenes de la cantidad de cloroplastos recuperados del Percoll). Centrifugar en un rotor Beckman JA-20 a 8,500 rpm por 5 min.
13. Resuspender la pastilla de cloroplastos en 6 mL de amortiguador A y pasarlo en un homogeneizador de vidrio con émbolo. Tomar alícuotas de esta fracción, medir el volumen total obtenido, cuantificar clorofila y proteína. Los cloroplastos son rotos dando 10 golpes con el émbolo. Dejar sobre hielo por 5 min y dar otros 10 golpes para asegurar la lisis completa. En este punto la preparación se puede guardar en un tubo Falcon de 15 mL estéril a -70°C ó continuar con el paso siguiente.
14. Pasar la preparación a un vaso de precipitados de 50 mL. La lisis de los cloroplastos puede observarse en un microscopio antes y después de la homogeneización. Después de la lisis no se ven tan refractarias. Agregar 7 mL de amortiguador B y un agitador magnético. Cortar la mezcla con 2.3 mL de una solución de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturada, agregando gota a gota a la solución. Agitar la mezcla a 4 °C por 30 min, evitando la formación de espuma.
15. Dividir la solución en 2 tubos con volúmenes iguales o ponerla toda en un tubo y el tubo de balance (este tubo se llena con aproximadamente 2/3 de amortiguador B y se ajusta con agua). Centrifugar por 2 h a 54,000 rpm a 4°C en un rotor 75 Ti (Ultracentrifuga Optima XL-100K, Beckman, EUA), sin freno, en tubos de pared gruesa de policarbonato (cap.

máx. 25 mL)

16. Mientras tanto hidratar la resina Sephacel DEAE (Amesham, EUA) (4 g de resina seca da aproximadamente 9 mL de resina hinchada) con el amortiguador de cromatografía. Colocarla en un tubo, decantarla. Repetir estos pasos 3 veces.
17. Después de la centrifugación en el paso 15, el SN es tomado y colocado en el tubo que contienen la resina hinchada, dejarlo en agitación a 4 °C toda la noche. Recolectar el SN después de que la resina ha sedimentado.
18. Las proteínas presentes en esta fracción son precipitadas agregando $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ finamente pulverizado en una relación de 0.28 g/mL de muestra. El polvo es agregado lentamente y la solución agitada por 30 min a 4 °C hasta que el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ esté completamente disuelto, evitando la formación de espuma.
19. La muestra es centrifugada nuevamente en un 75Ti a 36,000 rpm durante 20 min a 4 °C. Los tubos son drenados cuidadosamente, quitando el líquido de la parte interior del tubo.
20. La pastilla es resuspendida en 800 μL de amortiguador E. El tubo es lavado en 200 μL adicionales de amortiguador E para dar un volumen final de muestra de 1 mL.
21. La muestra es luego dializada 13 h en contra de 1 L de amortiguador E. El amortiguador de diálisis es cambiado y la muestra es dializada adicionalmente por 3 h más en contra de otro litro de amortiguador E.
22. La muestra es removida de la bolsa de diálisis y centrifugada a 4 °C por 10 min a 12,500 rpm en una microcentrífuga para remover las proteínas precipitadas. Alícuotas de 50 μL son congeladas a -70 °C.
23. Determinar la concentración de proteína del extracto de hoja, el extracto de cloroplastos y del extracto de procesamiento; así como los volúmenes correspondientes de cada una de las fracciones obtenidas.

6.4. Análisis de proteínas

6.4.1. Cuantificación de proteínas (Bradford, 1976).

El ensayo de proteína está basado en el cambio de color del colorante Azul brillante de Coomassie G-250 en respuesta a varias concentraciones de proteína. El colorante se une primariamente a residuos de aminoácidos básicos (especialmente arginina) y a residuos aromáticos. El ensayo es útil para medir proteínas y polipéptidos con masas moleculares

mayores de 3,000-5,000, dependiendo de los grupos cargados. Muchos detergentes y soluciones amortiguadora básicas pueden interferir con el ensayo. Las lecturas de la reacción colorimétrica se llevan a cabo a 595 nm.

Procedimiento

El procedimiento es el siguiente:

1. Preparar una curva estándar empleando una solución de 1 mg/mL de albúmina de suero de bovino (BSA) (No. Cat. A9647506, Sigma, EUA), disuelta en agua.

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

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

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

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

Donde:

A = absorbancia

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

m = pendiente

b = ordenada al origen

6.4.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970).

Se basa en el uso de dos soluciones amortiguadoras con diferentes pH, que generan un pH discontinuo y un gradiente de voltaje en el gel. El SDS es un detergente de acción desnaturizante que se une a las cadenas polipeptídicas. Esta unión masiva de moléculas de SDS bloquea la carga propia de la molécula de proteína y le confiere al complejo una carga neta negativa con una distancia de migración proporcional a su masa, haciendo que todas las proteínas acomplejadas con SDS viajen hacia el ánodo. La utilización de la poliacrilamida en el gel permite la formación de una red o malla que separa a las proteínas por su masa.

Soluciones

Poliacrilamida 30.8% (100 mL)

Acrilamida 30 g

Bisacrilamida 0.8 g

Amortiguador separador (100 mL)

1.5 M Tris base [pH 8.8] 18.17 g

SDS al 20% 2.0 mL

Amortiguador apilador (100 mL)

1.5 M Tris base [pH 6.8] 18.17 g

SDS al 20% 2.0 mL

Amortiguador de carga 5X (10 mL)

1M Tris [pH 6.8] 3.1 mL

Glicerol 5.0 mL

SDS (1% final) 0.5 mL

Azul de bromofenol 10% 0.2 mL

Por cada 20 μ L de buffer adicionar 4 μ L de β -mercaptoetanol.

Amortiguador de corrida 10X (1 L)

Tris base 30 g

Glicina 144 g

SDS 10 g

Persulfato de amonio 20 % (APS)

N, N, N', N'-tetrametiletildiamina

Procedimiento

1. Lavar, secar y montar dos vidrios con separadores de 1 mm de grosor para un gel.
2. Mezclar 1 mL de amortiguador separador, 2 mL de acrilamida, 1 mL de H₂O, 25 μ L de APS 20% y 2.5 μ L de TEMED. Verter.
3. En un vial mezclar 444 μ L de amortiguador apilador, 300 μ L de acrilamida, 1 mL de H₂O, 20 μ L de APS 20% y 5.0 μ L de TEMED. Agitar, verter y esperar a que polimerice.
4. Colocar rápidamente un peine de 10 pozos de 1 mm de grosor y fijarlo con una pinza. Dejarlo polimerizar por 20 min.
5. Enjuagar y colocar el gel en la cámara de electroforesis (Mini-PROTEAN II, BIORAD, EUA). Adicionar amortiguador de corrida 1X en el *casette* y cámara.
6. Preparar la muestra adicionando el volumen equivalente a 20 μ g de proteína, 5 μ L de amortiguador de carga y ajustar con agua hasta un volumen final de 20 μ L.
7. Hervir las muestras y el marcador de peso molecular por 3 min. Colocarlas rápidamente en hielo y cargarlas en los pozos del gel.
8. Correr el gel a 25 mA y parar la electroforesis 20 min después de que haya salido el frente de corrida.

6.4.3. Tinción de proteínas con nitrato de plata

Es una alternativa a la tinción rutinaria de geles de proteínas (así como de ácidos nucleicos y lipopolisacáridos) por su facilidad de uso y su gran sensibilidad, entre 50 y 100 veces más sensible que la tinción con Azul de Coomassie. Es una técnica de tinción especialmente recomendable para teñir geles bidimensionales y de isoelectroenfoque. Esta técnica fue tomada del método de entrecruzamiento de RNA-proteína con luz UV.

Soluciones

Solución 1

Metanol 50%

Solución 2

Ácido acético 12%

Solución 3

Metanol 10%

Solución 4

Ácido acético 5%

Solución 5 (10X)

$K_2Cr_2O_7$ 10 g/ L

HNO_3 2.05 mL/ L

Solución 6

$AgNO_3$ 0.2 g/L

Solución 7

Na_2CO_3 14.8 g/ 500mL

Formaldehído 0.5 mL/ L

Solución 8

Ácido acético 3%

Solución 9

Glicerol 5%

Procedimiento

1. Fijar el gel en 100 mL de solución 1 por 5 min
2. Pasarlo a 100 mL de solución 2 por 10 min.
3. Lavar el gel en 100 mL de la solución 3 por 5 min
4. Lavar el gel en 100 mL de la solución 4 por 10 min.
5. Remojar el gel en 50 mL de la solución 5 (1X), por 15 min.
6. Lavar el gel con abundante agua desionizada.
7. Remojar el gel en 50 mL de la solución 6 por 15 min.
8. Enjuagar 3 veces con agua desionizada.
9. Lavar el gel rápidamente en dos cambios de 150 mL de solución 7, por 5 min.
10. Descartar la solución de revelado y detener la reacción agregando 50 mL de la solución 8 por 5 min.
11. Lavar el gel revelado en 50 mL de la solución 9 por 10 min antes de secarlo.

6.5. Transcripción *in vitro* de los 3'UTRs

El fundamento de la técnica de transcripción *in vitro* es la presencia de uno de los promotores T7 ó SP6 en el vector o en la secuencia clonada y el empleo de las RNA polimerasas que los reconocen específicamente. El mRNA se produce a partir de la transcripción del DNA molde, el cual se puede marcar radiactivamente utilizando [α -³²P-UTP] (Ausubel *et al.*, 1996). Este protocolo es adaptado del publicado por Schuster y Gruissem (1990).

Una vez clonados los extremos 3'UTR se realizó la transcripción *in vitro* de cada uno de ellos a 25°C por 1 h. Posteriormente, los mensajeros sintetizados y marcados radioactivamente se corrieron en un gel de poliacrilamida-urea para su purificación, se eluyeron para después cuantificar la cantidad de RNA y la actividad específica de cada preparación y se almacenaron a -70°C, para su posterior uso en los ensayos de procesamiento y entrecruzamiento.

Soluciones

DTT	40 mM
GTP, CTP, ATP	5 mM
UTP	0.25 mM
[α-³²P]UTP	800 Ci/mmol, 10 mCi/mL (No. cat. BLU507X. NEN, EUA)
Acetato de amonio	5 M
Acetato de sodio	3 M [pH 5.5]
EDTA	0.25 M
SDS	20 %

Amortiguador de carga

Xilencianol y azul de bromofenol al 0.1%

Formamida desionizada (libre de RNAsas) c.b.p.

Nota: El agua utilizada en la preparación de todas las soluciones debe tratarse con DEPC (dietilpirocarbonato) 800 μ L/L de agua durante 12 hrs con agitación, esterilizarse por autoclave.

Procedimiento

1. Digerir el DNA del plásmido con la enzima de restricción apropiada para linearizarlo (ver Tabla 5) y purificarlo con el sistema QIAEX de extracción de DNA de geles de agarosa (QIAGEN, EUA), resuspendiendo el DNA en agua. Cuantificar a 260 nm y si es necesario, concentrar en el *Speedvac* hasta que la concentración final del plásmido linearizado sea de 1 μ g/ μ L.
2. En un tubo Eppendorf combinar 1 μ L de DNA plasmídico (1 μ g), 4 μ L de amortiguador 5X de la RNA Polimerasa que se va a emplear, 0.2 μ L de DTT 100 mM, 4 μ L de la mezcla A/G/CTP 5 mM, 2 μ L de UTP 500 μ M y 1.0 μ L RNAsin (Promega, EUA).
3. Adicionar 2 μ L de [α -³²P] UTP equivalente a 10 μ Ci/ μ L u 800Ci/mmol.
4. Agregar 1 μ L (20 U) de la RNA polimerasa correspondiente.
5. Incubar a 37 °C durante 60 min (revisar las condiciones especificadas para cada enzima en el protocolo correspondiente).

6. Adicionar 15 μL de NH_4OAc 5M y 100 μL de etanol.
7. Incubar durante 10 min a -20°C , centrifugar 10 min en microcentrífuga a máxima velocidad. Quitar el etanol, dejar secar y adicionar 7 μL de amortiguador de carga.
8. Hervir las muestras por 3 min. Ponerlas en hielo. Cargar las muestras en un gel de acrilamida-urea (5%) (ver técnica: Electroforesis de RNA en gel de acrilamida).
9. Correr el gel a 1000 V (aprox. 25 mA) hasta que el colorante llegue al extremo inferior del gel.
10. Colocar el gel sobre un vidrio y cubrirlo con plástico. Exponerlo a una película fotográfica (aproximadamente 30 seg) y revelarla.
11. Cortar la banda del gel que contiene el RNA radiactivo sintetizado y colocarla en un tubo Eppendorf de 1.5 mL
12. Añadir al tubo 180 μL de H_2O (tratada con DEPC), 20 μL NaOAc 3 M [pH 5.5], 1 μL de EDTA 0.25 M y 1 μL de SDS al 20 %.
13. Incubar a 65°C durante 1-1.5 h o a 4°C durante toda la noche. Recuperar la solución amortiguadora de elución. Añadir 500 μL de etanol. Poner el tubo a -20°C durante 15 min.
14. Recuperar el RNA precipitado centrifugando en una microcentrífuga por 20 min a máxima velocidad. Dejar secar el precipitado y resuspenderlo en 20 μL de agua tratada con DEPC. Esta solución es para el análisis de procesamiento. Medir la incorporación del nucleótido marcado por radiaciones $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ y cuantificar por triplicado el RNA a 260 nm.

6.6. Análisis de los 3'UTRs de mensajeros cloroplásticos de *A. thaliana*

6.6.1. Electroforesis de RNA en geles de poliacrilamida desnaturalizante

Debido a que el RNA poseen un mayor tamaño que las proteínas y estructuras secundarias complejas, es necesario separarlo electroforéticamente en geles en condiciones desnaturalizantes. Este tipo de electroforesis fue desarrollado por Panyim y Chalkley (1990). Estos geles se preparan con persulfato de amonio como activador y TEMED como catalizador. Este es un protocolo modificado de Schuster y Grussem (1990).

Soluciones

Solución TBE 10 X (1L)

0.9 M Tris base [pH 8.0]	100 g
0.9 M Ácido bórico	55 g
0.5 M EDTA	20 mL
H ₂ O c.b.p.	1 L

Solución A (100 mL)

0.5 X TBE	5 mL (10X)
7 M Urea	42.1 g
15% Acrilamida	15 g
0.75% Bis-acrilamida	0.75 g

Solución B (100 mL)

0.5 X TBE	5 mL (10 X)
7 M Urea	42.1 g

Persulfato de amonio (APS) 20%

TEMED

Amortiguador de carga

Xilencianol y azul de bromofenol al 0.1%

Formamida desionizada (libre de RNAsas) c.b.p.

Procedimiento

1. Limpiar perfectamente los vidrios en donde se preparará el gel de poliacrilamida (18 x 18 x 0.08 cm).
2. Para un gel de 5%, mezclar 10 mL de solución A, 20 mL de la solución B, 105 µL APS 20% y 12 µL TEMED.
3. Vaciar el gel, usar TBE 0.5X como amortiguador de corrida.

4. Precorrer el gel a 1000 mA hasta alcanzar una temperatura de 50 °C. Dejar enfriar el gel. Cargar las muestras de RNA en el gel y correr el gel a 20 mA hasta que el azul de bromofenol comience a salir del gel (20-30 min, 1000V).
5. Desmontar el sandwich con el gel y cuidadosamente separar los vidrios.
6. Si se hizo este gel para purificar el producto de una transcripción *in vitro*, quitar solamente uno de los vidrios y cubrir el gel con Ega pack. Cortar el producto de transcripción para su purificación.
7. Si se hizo este gel para analizar la actividad de procesamiento de RNA, transferir el gel a papel Whatman 3 MM, recubrirlo con Ega pack y secar el gel en un secador de geles usando una hoja adicional de papel Whatman 3MM.
8. Exponer el gel seco a película de rayos X a -70°C de 6 a 10 h o toda la noche con una pantalla intensificadora.

6.6.2. Procesamiento de RNA *in vitro*

El procesamiento es un término que describe la modificación de una molécula de RNA recientemente sintetizada. En un típico experimento de procesamiento de 3'UTRs *in vitro*, es necesario sintetizar el precursor del mRNA a procesar, marcado radioactivamente. El precursor marcado se mezcla con el extracto proteico y se incuban a temperatura ambiente, tomando alícuotas a diferentes tiempos para seguir el transcurso de la reacción. Posteriormente se purifican los productos de la reacción y se analizan en geles de poliacrilamida-urea por autoradiografía (Stern y Gruissem, 1987).

Soluciones

Amortiguador IVT 20X (10 mL)

75 mM MgCl ₂	0.75 mL de 1 M
40 mM DTT	0.4 mL de 1 M
200 mM KCl	1.0 mL de 2 M
H ₂ O c.b.p.	10 mL

Amortiguador E (2 L)

20 mM HEPES [pH 7.9]	40 mL de 1M
60 mM KCl	60 mL de 2 M
12.5 mM MgCl ₂	25 mL de 1 M
0.1 mM EDTA	1 mL de 0.2 M
2 mM DTT	4 mL de 1 M
5 % de Glicerol v/v	100 mL
H ₂ O c.b.p.	2 L

Solución de paro de la reacción

6 M Urea
4.5 mM Ácido aurintricarboxílico
1% SDS

Acetato de sodio 3M [pH 5.5]

tRNA de *Sacharomyces cerevisiae* 10 mg/mL

Nota: Todas las soluciones que son usadas durante las incubaciones de RNA deben prepararse con DEPC (dietilpirocarbonato) y esterilizarse por autoclave

Procedimiento

1. Para los ensayos de procesamiento combinar en diferentes tubos Eppendorf lo siguiente:

	<i>A. thaliana</i>	Espinaca
Amortiguador IVT 20X	1.5 µL	1.5 µL
EP (20 µg proteína)	L = 6.0 µL	2.0 µL
Amortiguador E	M = 9.0 µL	13.0 µL (L+M = 15.0 µL)
mRNA radiactivo (2000 cpm)	X = 1.0 µL	1.0 µL
H ₂ O DEPC	Y = 12.5 µL	12.5 µL (X+Y = 13.5 µL)

2. La reacción se inicia agregando el EP (L), mezclar suavemente y dar un pulso de centrifugación a la muestra de reacción en una microcentrífuga. Incubar a temperatura ambiente de 0 a 60 min para cinética. Sacar alícuotas de 5 µL a los 5, 20 y 60 min.

3. Poner la alícuota en un tubo con 45 μ L de la solución de paro, mezclar y mantenerlo en frío.
4. Agregar 50 μ L de una solución fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:25:1), mezclar y centrifugar a máxima velocidad por 2 min a temperatura ambiente. Remover la fase acuosa (superior), pasarla a un tubo limpio y descartar el fenol.
5. Agregar 1 μ L de acetato de sodio 3M (pH 5.5), 1 μ L de tRNA (10 mg/mL) y 125 μ L de etanol frío. Incubar 10 min a -20 °C y centrifugar 10 min a 4 °C.
6. Cuidadosamente remover el etanol, secar la pastilla por 5 min en el Speedvac, lavar la pastilla con 10 μ L de EtOH 70% frío. Disolver la pastilla de RNA en 7 μ L de formamida.

Tabla 5. Enzimas de restricción y RNA polimerasas empleadas para la linearización y transcripción respectiva de los insertos clonados.

3'UTR	ENZIMAS DE RESTRICCIÓN EMPLEADAS PARA LINEARIZAR EL PLÁSMIDO	RNA POLIMERASA
At3'psbA	<i>Bam</i> HI	T7
At3'petD	<i>Sac</i> II	SP6
At3'rbcL	<i>Kpn</i> I	T7
So3'psbA	<i>Bam</i> HI	T7
So3'petD	<i>Xba</i> I	T7
So3'rbcL	<i>Sac</i> II	SP6

6.6.3 Entrecruzamiento de RNA-proteína con luz-ultravioleta (X-UV)

Esta técnica de entrecruzamiento con luz ultravioleta (X-UV) permite la detección de interacciones proteína-ácido nucleico. Es un método sencillo y útil en la determinación del tamaño y número de proteínas que se unen a un mRNA. En los ensayos de X-UV las proteínas son marcadas indirectamente al unirse covalentemente a un RNA sintetizado radiactivamente, al ser irradiado con un pulso de luz ultravioleta. Esta irradiación con UV genera, en los ácidos nucleicos, radicales de purinas y pirimidinas que se pueden unir covalentemente con algunos aminoácidos (cisteína, serina, metionina, lisina, arginina, histidina, triptofano, fenilalanina y tirosina). La mezcla de reacción es tratada con RNAsa a fin de degradar el mRNA que no se

unió a las proteínas. Finalmente, se analiza la unión separando las proteínas en un gel SDS-PAGE y revelando por autoradiografía (Gruissem, 1990).

Soluciones

Amortiguador IVT 20X (10 mL)

Ver receta en la sección 6.6.2. Procesamiento de RNA *in vitro*

RNAsa A (No. de catálogo 109169, Roche, EUA) 1 µg/µL

Procedimiento

1. En un Eppendorf de 1.5 mL mezclar a un volumen final de 15.75 µL; amortiguador IVT 20X, 0.75 µL y DTT 40 mM 0.2 µL por reacción. Estos reactivos se mezclaron con 3 µL de RNA radioactivo sintetizado *in vitro*, para cada reacción. Esta mezcla se hace interaccionar con 6.0 µL de EP (20 µg de proteína) y ajustar el volumen con el amortiguador E.
2. Incubar a 4 °C durante 5 min.
3. Abrir los tubos cuidadosamente y colocarlos en el generador de luz ultravioleta (Mod. CL-1000, UVP, EUA). Operando en el modo Energy, dar 1.8 Joules (2 veces 9000 en la escala).
4. Agregar 1 µL de RNAsa A (0.5-1µg/µL) e incubar 20 min a 37°C.
5. Agregar 4 µL de amortiguador de carga para geles de acrilamida (5X) (Laemmli) y calentar las muestras a 80-100°C durante 1 min. Cargar en un gel SDS-PAGE al 15%.
6. Correr el gel a 20 mA a corriente constante hasta que el azul de bromofenol haya alcanzado la base del gel.
7. Cuidadosamente separar las placas de vidrio y remover el gel a un papel filtro.
8. Secar el gel y exponerlo en películas para autoradiografía.
9. Utilizar el equipo Molecular Imagen FX Bio-Rad con el programa Quantity one, para revelar la unión de las proteínas al 3'UTR.

7. RESULTADOS

7.1. Clonación de los extremos 3'UTR de los genes *psbA*, *petD* y *rbcL* de *Arabidopsis thaliana* y *rbcL* de *Spinacea oleracea*

Con el fin de verificar que los extremos 3'UTR hubieran sido clonados exitosamente se realizaron ensayos de restricción de los productos de ligación. Para los plásmidos con los insertos At3'petD, At3'psbA y So3'rbcL se hicieron digestiones con *Bst*ZI y para At3'rbcL una doble digestión con *Bam*HI/*Kpn*I. Los tamaños de los insertos liberados después de las restricciones, corresponden a los fragmentos clonados más las secuencias del vector incluidas entre los sitios de restricción empleados en el análisis. Los tamaños de las bandas fueron aproximadamente las esperadas: para At3'psbA, 380 nt; At3'petD, 226 nt; At3'rbcL, 505 nt y So3'rbcL, 445 pb (Fig. 4). Estos resultados indicaron que en esos plásmidos se llevaron a cabo las ligaciones esperadas, más no que estos insertos correspondieran a los 3'UTR, aunque por los tamaños presentados lo más probable es que sí lo fueran. La confirmación definitiva se realizó a través de la secuenciación de los insertos (Fig. 5) y su correspondiente verificación con el programa BlastN, que compara la secuencia desconocida, con las registradas en el Banco de Genes (GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

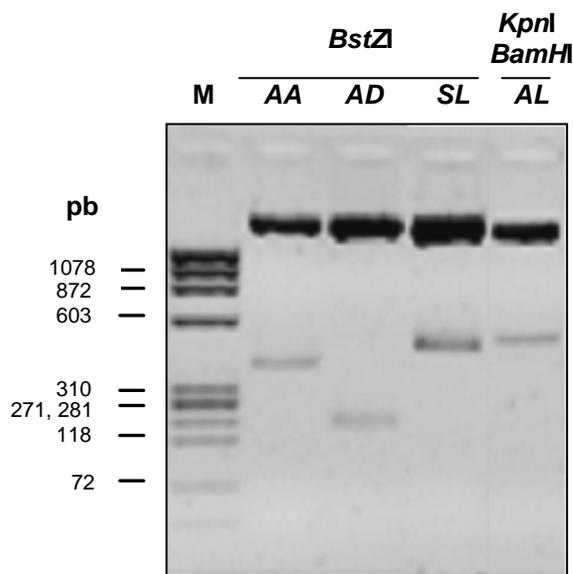


Figura. 4. Gel de agarosa al 1.4% teñido con bromuro de etidio que separa los insertos clonados mediante ensayos de restricción. M) Marcador de tamaño correspondiente al fago ϕ X174 cortado con *Hae*III. Los insertos liberados: At3'psbA (AA), At3'petD (AD), At3'rbcL (AL) y So3'rbcL (SL).

At3'psbA

351 *tgctgttgaggctccatctacaaatgggataa*ttcgttagtgtttagtctagatctagtttagt 31U
32U *aaaaaacgagcaatataagccttctttaaataagaaagagggttatattactcgtttttt* 93U
94U *ctataaaaaatgagcaaatttttatagagtatcatattttacttttatttattatattaataat* 155U
156U *aaataataataataataataaaaaattactatatattttttattagaaaaaaaataagggtg* 217U
218U *gaatttgctacctttttttattttttattgaaatttgatttttttttttttttttttagaca* 279U
280U *atacaaaaaagaatagatagtagcgtaggggcggtat* 315U

At3'petD

435 *tggagcaacattaccgattgataaatctctaacttttaggtccttttttaattcaattttattca* 13U
14U *attgtaaaataaacgacgtgggtatctagggaggtatctagggagtagtcatttccaaatga* 76U
77U *attctccctagatacatatctaattctaattaatttaattaattaataaaaatgggttcgac* 148U
149U *tggaaa* 154U

At3'rbcl

1366 *tgctgcttgtgaagtatggaagagatcacatttaacttccaaccatcgataaattagatg* 1428
1429 *gccaagagttagatgaattagatttagtaattcacgtttgttttattagtttaattgcactcg* 51U
52U *gctcaatcttttttttactaaaaaagattgagccgaggttatctggtgtatataactatttt* 113U
114U *tttgatagatacacttaaattttagatagaaaaaaaactcttcaataaaaaaaaagaagatt* 175U
176U *aaacacaactacaattttgttattgtagtggtgtgtccacaagaaatcctatacgaaacatg* 237U
238U *gattcttaattcttaggagtggtatattctttcgtgtcagggcttgaaccaagtatccccgc* 299U
300U *ttcttctacccatcctgcatgttgctcttttcttttcattccgtattggaataaaaaaagt* 362U
363U *ttttttttatattagtatacagagattttactaaaaaagtcttaaatattcttatattcataa* 425U
426U *gcgaagaac* 434U

So3'rbcl

1368 *tgctgcttgtgaagtatggaaggaaatcaaatttgaattcccagcaatggatacagtc*tagg 1U
2U *ctaagtaattaatgtccggtctcttaataataattgtaattaaactcggcccaatcttttact* 63U
64U *aaaaggattgagccgaatacaattattgtagatattgtatctctctatttcaagagactt* 125U
126U *atttagatatacaggcaagatcttaaaatacaaaattgaataactaaacaactcaaactacta* 187U
188U *tatattgtcttggatctataattaatcctacggtagcgatccttaggattggtagaattggg* 249U
250U *agattcttatacatattccgtgggctcggactacggctgtggatcaagtcaagtatacga* 311U
312U *actccttctacccatcctctatattgtccttttcggtcc* 350U

Figura 5. Secuencias de los 3'UTR clonados de *A. thaliana* y espinaca. Los insertos están constituidos de una **región codificadora** (letras y números en cursivas), hasta el **codón de paro** (cursivas en negritas), luego continúa el **3'UTR** (números en negritas) que es donde está la **estructura tallo-asa** (subrayadas). Estas secuencias se compararon con las secuencias registradas en el Banco de Genes (GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). La numeración de la región codificadora es igual a la registrada en el GenBank.

Para todas las secuencias de los insertos clonados se obtuvo de manera correspondiente un 100% de identidad con las secuencias registradas en el GenBank de los genes *psbA* (gi|5881673|dbj|AP000423.1| REGION: 383..1444), *petD* (gi|5881673|dbj|AP000423.1| REGION: 76481..76488) y *rbcL* de *A. thaliana* (gi|5881673|dbj|AP000423.1| REGION: 54958..56397), así como *rbcL* de espinaca (gi|7636084|emb|AJ400848.1|SOL400848, REGION: 53825..55252). Las construcciones de So3'psbA y So3'petD, se realizaron previamente en nuestro laboratorio (Arenas Huertero, 2003).

Las secuencias de los genes correspondientes se alinearon utilizando el programa ClustalW (Work Bench, <http://workbench.sdsc.edu>) (Fig. 6). Del siguiente análisis se extrajeron las siguientes observaciones: en la región codificadora de los transcritos At3'psbA y So3'psbA alinean perfectamente 29 de un total de 31 nt (93% de identidad). La distancia del codón de paro al tallo-asa fue de 31 nt para At3'psbA y de 30 nt para So3'psbA, mientras que el tamaño de la estructura tallo-asa fue de 61 nt para At3'psbA y 73 nt para So3'psbA. De la secuencia que conforma el tallo-asa solo 37 nt son idénticos (61%) (Tabla 6). En la región codificadora de At3'petD/So3'petD alinean 47 de 49 nt (94% de identidad). La distancia del codón de paro al tallo-asa fue de 31 nt para So3'petD y 46 nt para At3'petD, mientras que el tamaño de la estructura tallo-asa fue de 44 nt para ambos genes. Sólo 6 nt de los 44 nt que conforman la estructura tallo-asa no son idénticos (86% de identidad) (Fig. 6 y Tabla 6). En la región codificadora de At3'rbcL/So3'rbcL alinean 50 de 61 nt (82% de identidad). La región codificadora de At3'rbcL es 12 nt más grande que la de So3'rbcL, ya que At3'rbcL tiene tres codones más que la secuencia de espinaca, por lo que codifica tres aminoácidos extras que se encuentran al final de la región carboxilo de la RuBisCO de *Arabidopsis* (Sato *et al.*, 1999). La distancia del codón de paro al tallo-asa fue de 45 nt para So3'rbcL y 47 nt para At3'rbcL, mientras que el tamaño de la estructura tallo-asa fue de 41 nt para At3'rbcL y 34 nt para So3'rbcL. De la secuencia que conforma el tallo-asa, 32 nt son idénticos (94% de identidad) (Fig. 6 y Tabla 6).

C)

```
So3' rbcL TGCTGCTTGTGAAGTATGGAAAGGAAATCAAATTTGAATTCCCAGCAATGGATACA-----
At3' rbcL TGCTGCTTGTGAAGTATGGAAAAGAGATCACATTTAACTTCCCAACCATCGATAAAATTAGA

So3' rbcL -----GTCtagGCTAAGTAATTAATGTCC----GGTCTCTTAATATAAATTGTAATTAA
At3' rbcL TGGCCAAGAGtagATGAATTAGATTTAGTAATTCACGTTTGTTC-TATTAGTTTAATTGC

So3' rbcL ACTCGGCCAATCTTTT-----ACT-AAAAGGATTGAGCCGAATACAATTATTGTAGATAT
At3' rbcL ACTCGGCTCAATCTTTTCTTTTACTAAAAAAGATTGAGCCGAGTTATCTGTTGTA--TAT

So3' rbcL ATTGTATCTCTCTATTTCAAGAGACTTA--TTTAGATATACAGGCAAGATCTTAAATACA
At3' rbcL ACTATTTTTTTTTGATAGATACATACTTAAATTTAGATAGA-AAAAAACTCTTCAATAAA

So3' rbcL AAATTGAATACTAAACA--ACT-CAAACCTTACTATATATTGTCTTGGATCTATAAATTAAT
At3' rbcL AAAAAAGAAGATTAAACACAACCTACAATTTTGTAT-TGTAGTGTGTGTCACACAAGAAAT

So3' rbcL CCTACG----GTACGGATCCTTAGGATTGGTAGAATTGGTAGATTCTTATACAT-ATTCC
At3' rbcL CCTATACGAAACATGGATTCTTA--ATTCTTAGGAGTGTATATTCTTTTCGTGTCAGGGC

So3' rbcL GTGGGCTCGG-ACTACGGCTGTGGATATCAAGTCAAGTATACGAACTCCTTCTACCCATC
At3' rbcL TTGAACCAAGTATCCCCGCTTCTTCTACCCCATCTGCATGTTGTCTTTTCTTTTTCATT

So3' rbcL CTCTAT-----ATTGTCCTTTTTCGTTCC-----
At3' rbcL CCGTATTGGAATAAAAAAAGTTTTTTTTTATATTAGTATACGAGATTTTACTAAAAAAGT

At3' rbcL TCTTAATATCTTATATTCATAAGCGAAGAAC
```

Figura 6. Continuación.

Dado que se ha postulado que el procesamiento de los 3'UTR de mRNA cloroplásticos se inicia con un corte endonucleolítico unos nucleótidos adelante del tallo-asa, se han identificado o propuesto secuencias que podrían ser sitios de reconocimiento de endonucleasas (SRE), en algunos genes. Así, para So3'psbA se ha identificado un posible SRE 23 nt después del tallo-asa, en la secuencia UAAAUUU (Westhoff y Herrmann, 1988). Con base en el alineamiento entre este gen y el At3'psbA se puede sugerir que para este último, un posible SRE se localiza a 14 nt después de la estructura tallo-asa y está conformado por un motivo CAAAUUU. Esta región se encuentra en una pequeña asa aunque también se aparearía formando parte de una doble cadena.

Tabla 6. Características de los RNAs transcritos *in vitro*. Estos transcritos están constituidos por una pequeña región codificadora y el extremo 3'UTR, donde se encuentra la estructura tallo asa. Todos ellos fueron clonados bajo el control del promotor de la RNA polimerasa indicada. **(b)** Número de bases.

PLÁSMIDOS	TAMAÑO INSERTO (b)	REGIÓN CODIFICADORA (b)	DISTANCIA DEL CODÓN DE PARO AL TALLO-ASA (b)	TALLO ASA (b)	ΔG DEL TALLO-ASA (kJ/mol)	DISTANCIA DEL TALLO-ASA AL FINAL DEL INSERTO (b)	RNA POL
At3'psbA	346	31	31	61	-29.7	223	T7
So3'psbA	283	99	30	73	-33.7	81	T7
At3'petD	192	49	46	44	-21.9	53	SP6
So3'petD	216	78	31	44	-25.2	60	T7
At3'rbcl	505	73	47	41	-23.1	344	T7
So3'rbcl	411	61	45	34	-14.3	271	SP6

En el caso de So3'petD, se ha propuesto que existe un SRE, 4 nt después del tallo-asa, presentando una secuencia que es AUUCAUU (Yang y Stern, 1997, Chen y Stern; 1995). Para el caso de At3'petD, pudimos identificar una secuencia que podría ser un SRE (AUAUCU), inmediatamente después del tallo-asa, en un región no apareada, antes del tallo. Una secuencia más parecida a la propuesta para espinaca, AUUCUAUU, también se presenta aunque está apareada en un tallo.

En el caso de So3'rbcl se ha propuesto que existe un SRE (AUACAAUU), inmediatamente después del tallo-asa, aunque en nuestro plegamiento, esta secuencia se observa apareada formando un tallo (Yang y Stern, 1997). Una secuencia rica en AU (AUUU), parecida a la propuesta para espinaca, está 31 nt después del tallo-asa en una región no apareada (*loop*), la cual podría ser también un SRE. No existen datos que demuestren cual es el sitio correcto. Para At3'rbcl se observa una secuencia semejante a la reportada para So3'UTR a 14 nt después del tallo-asa, en una región apareada que presenta un pequeño *loop* al inicio de la secuencia (Fig. 6 y 7).

7.1.1. Análisis teórico del plegamiento de las secuencias de los extremos 3'UTR

Para determinar el posible sitio de corte de la estructura tallo-asa presente en el extremo 3'UTR, se identificaron y compararon las posibles estructuras tallo-asa presentes en los mRNA sintetizados *in vitro*, a través de un análisis teórico (basado en un modelo termodinámico) del plegamiento de dichas secuencias presentes en los seis 3'UTR, utilizando el programa mfold (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/rna/form1.cgi>) (Mathews *et al.*, 1999) (Fig. 8). Este análisis se realizó a 37°C, a fin de obtener el cálculo de la energía libre de cada una de las estructuras correspondientes a los tallos-asas para cada transcrito (Tabla 6).

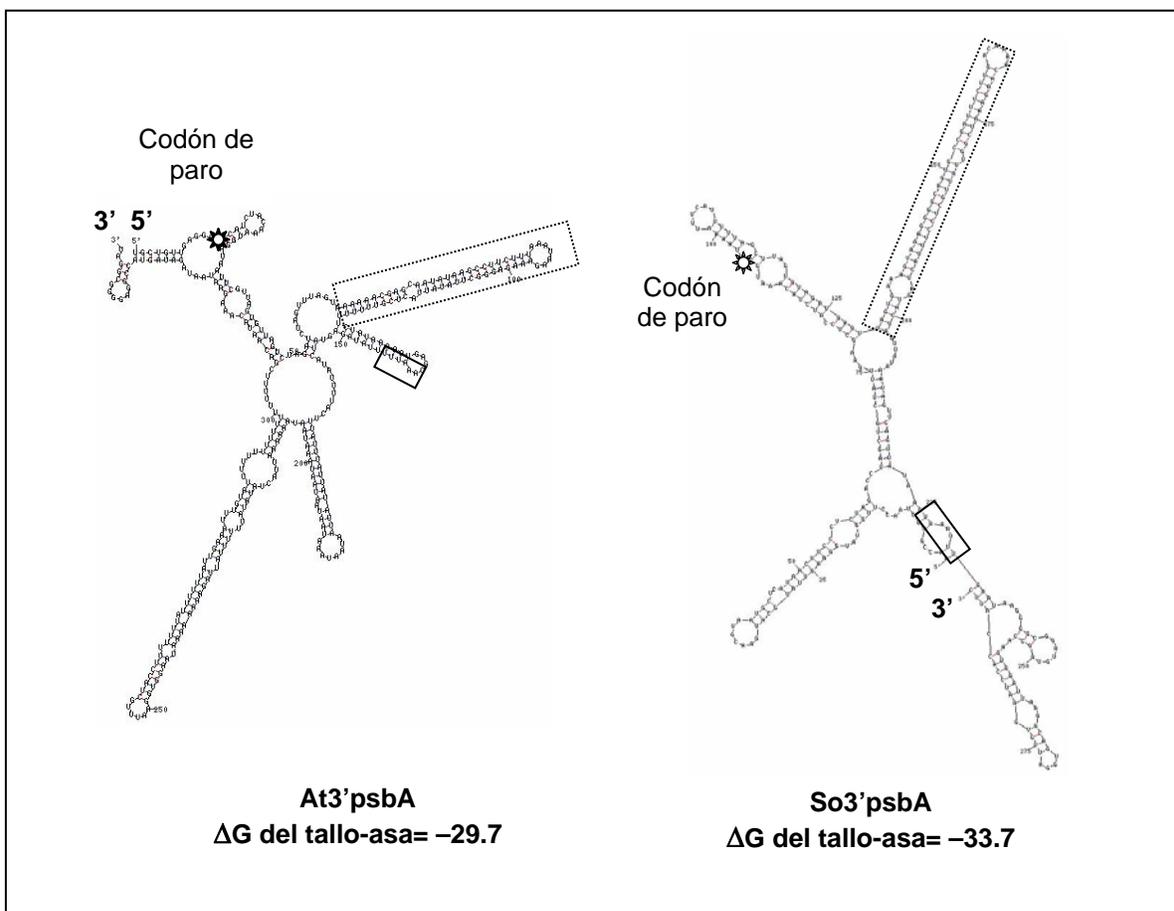


Figura 7. Estructuras secundarias de At3'psbA y So3'psbA. Las construcciones están constituidas por un segmento de la región codificadora hasta el codón de paro (asterisco), donde inicia el extremo 3'UTR, que es donde se encuentra la estructura tallo-asa (señalada en un rectángulo punteado). El rectángulo con línea sólida representa el posible sitio de reconocimiento de endonucleasas (SRE). El análisis teórico del plegamiento de las secuencias de los 3'UTR completos se hizo empleando el programa mfold (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/rna/form1.cgi>).

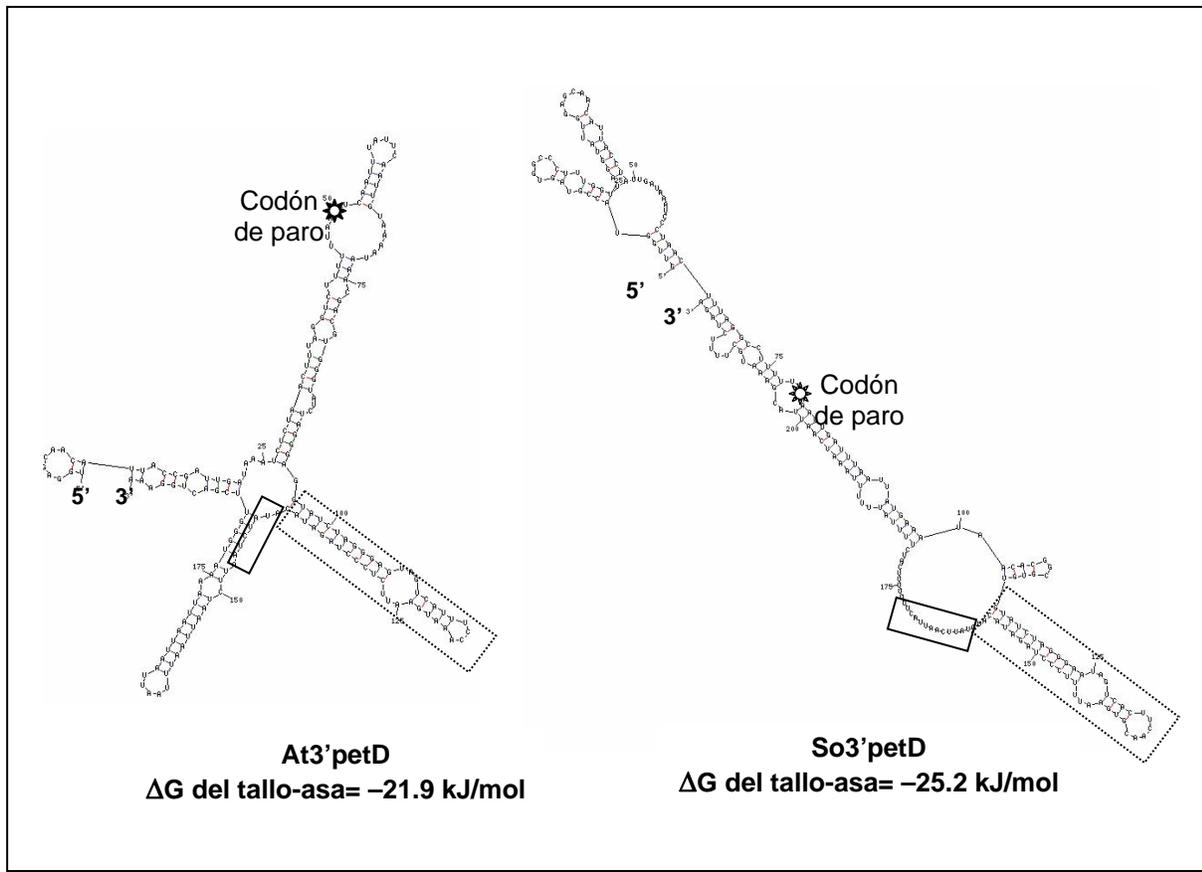


Figura 7. Continuación.

Este análisis mostró, en general, semejanza en la región codificadora y su estructura tallo-asa, mas no así entre las estructuras secundarias totales de las secuencias completas de los mRNA analizados (Fig. 7). Así observamos que para *petD* el tallo-asa es casi idéntico entre espinaca y *Arabidopsis* mientras que en *rbcL* se observa una diferencia más marcada ya que el tallo-asa de *Arabidopsis* es más largo mientras que el tallo-asa de espinaca presenta una burbuja y es más corto que el de *Arabidopsis*.

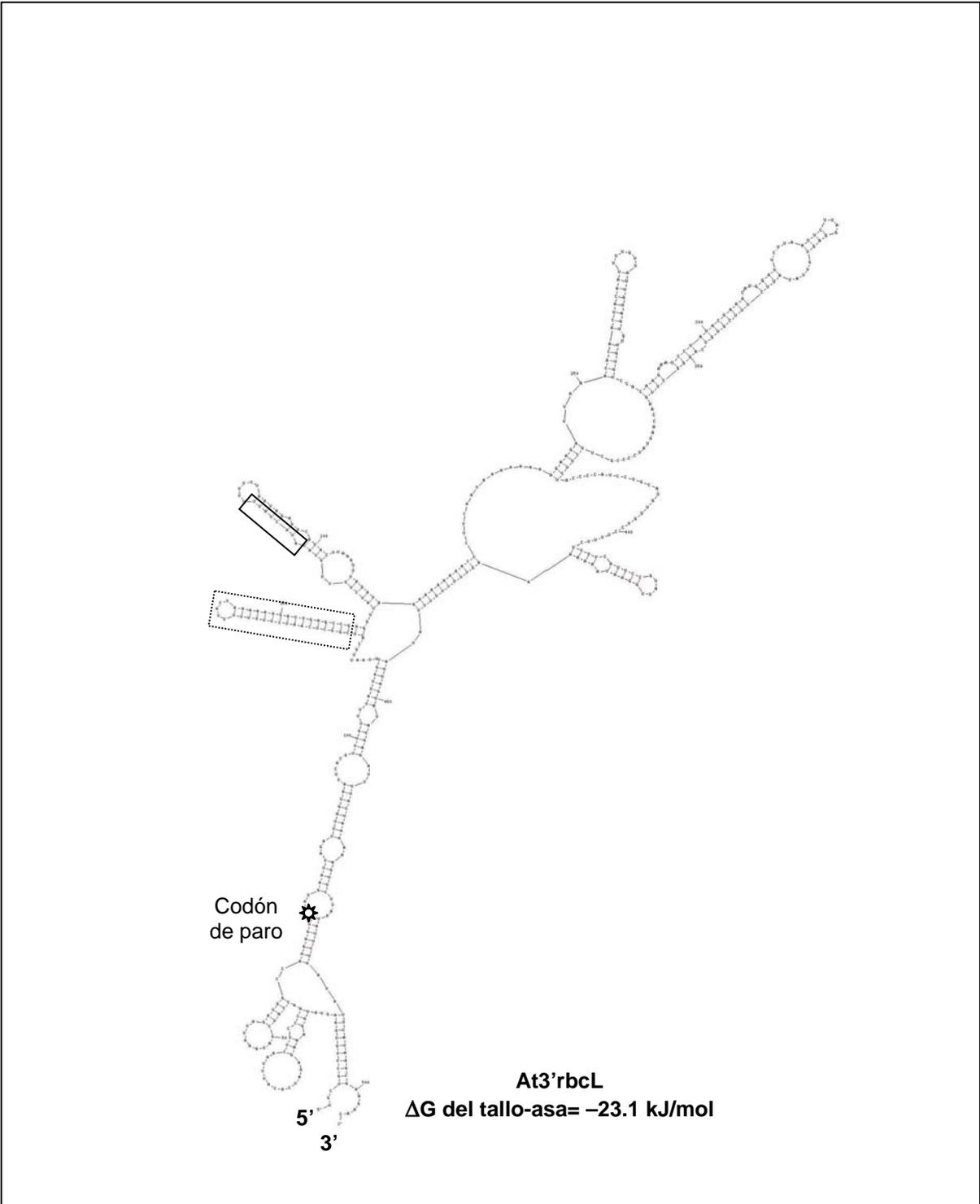


Figura 7. Continuación.

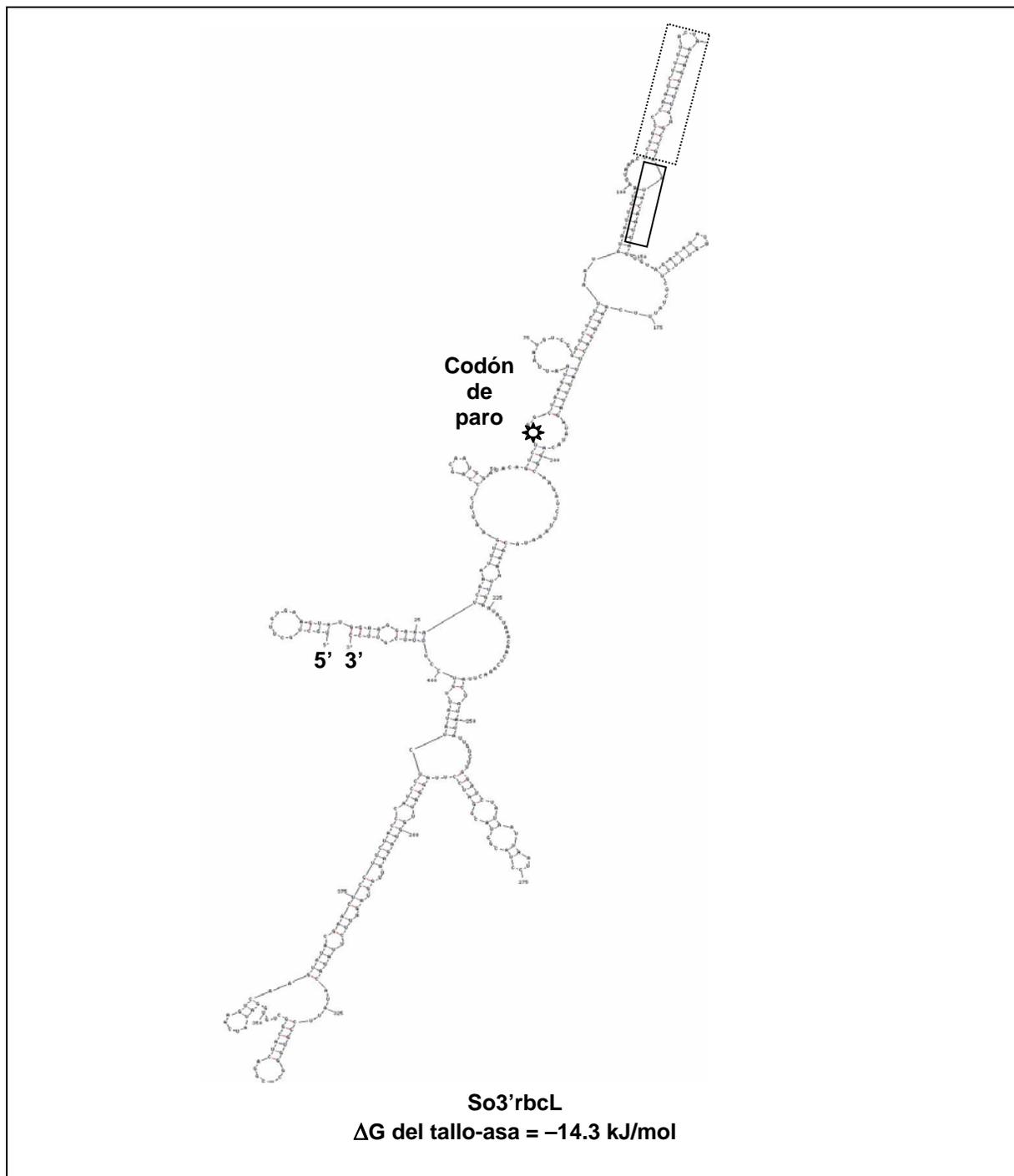


Figura 7. Continuación.

7.2. Transcripción *in vitro* de los extremos 3'UTR

Las secuencias de los extremos 3'UTR de los genes clonados bajo el promotor de las RNA polimerasas T7 o SP6 se transcribieron *in vitro* empleando [α - 32 P]-UTP. Los productos radiactivos de cada reacción se separaron en un gel de poliacrilamida-urea y sus posiciones en el gel fueron identificadas por autoradiografía. En cada reacción se obtuvo mayoritariamente una banda correspondiente al RNA del tamaño esperado (Fig. 8). Los tamaños esperados fueron para At3'psbA, 393 nt; At3'petD, 279 nt; At3'rbcL, 553 nt; So3'psbA, 292 nt; So3'petD, 219 nt y So3'rbcL, 498 nt. En algunos casos se observaron bandas pequeñas las cuales eran productos espurios de la reacción. Las bandas correspondientes a los productos correctos fueron cortadas del gel y purificadas. Los tamaños de los RNAs transcritos *in vitro*, así como la longitud de las diferentes secciones de ellos se muestran en la Tabla 6.

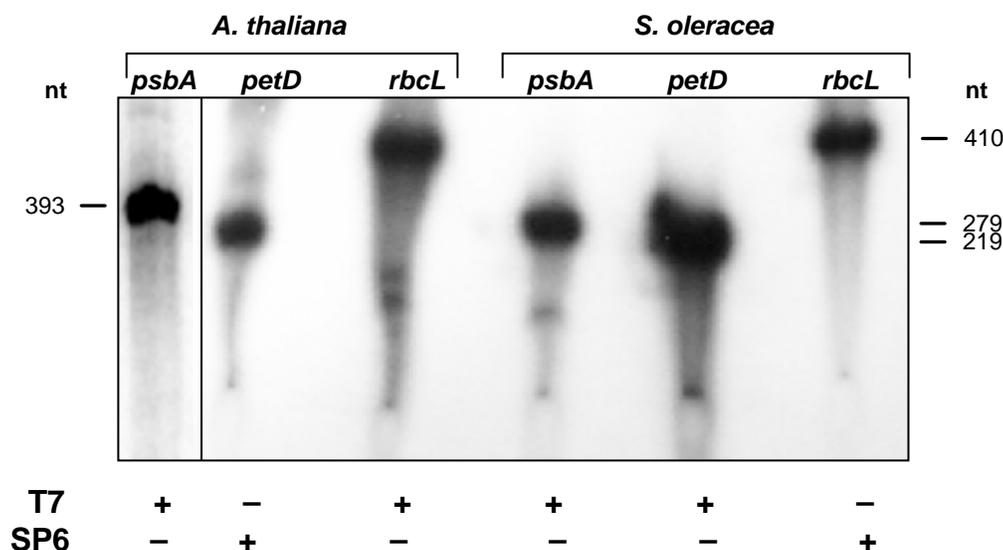


Figura 8. Autorradiografía de un gel desnaturalizante en donde se separan los productos de transcripción *in vitro*, correspondientes a los 3'UTRs marcados radiactivamente con [α - 32 P]-UTP. Las transcripciones se realizaron usando 1 μ g de DNA molde y 10 U de T7 o SP6 RNA polimerasa como se indica. Se presenta la autoradiografía de los RNAs radiactivos sintetizados, los cuales fueron separados en un gel de poliacrilamida-urea y posteriormente purificados. Nota: El gel corrió un poco más del lado derecho.

7.3. Proteínas cloroplásticas de los EP de *A. thaliana* y *S. oleracea*

A partir de hojas de *A. thaliana* se obtuvieron cloroplastos intactos preparados en gradientes de Percoll. De estos cloroplastos se preparó el extracto de procesamiento de RNA de *Arabidopsis* (EP). El EP de espinaca fue preparado según el protocolo publicado por Schuster y Gruissem (1990) con la asesoría del Dr. Martín Vargas Suárez, también a partir de cloroplastos intactos.

Las proteínas obtenidas de las preparaciones de CI (Fig. 9A) y las obtenidas de los EP purificados de espinaca y *A. thaliana* (Fig. 9B) fueron separadas en geles de SDS-PAGE y teñidas con azul de Coomassie. Al comparar los perfiles proteicos se observan algunas bandas semejantes en intensidad mientras que otras se observan en cantidades diferentes. Por ejemplo, la abundancia de la subunidad grande (55 kDa) de la RuBisCo (LSU) en el extracto de CI de espinaca es mayor que en el de *A. thaliana*. Por el contrario, una proteína de 142 kDa es más abundante en *A. thaliana* que en espinaca. En los CI de espinaca las bandas de mediana intensidad corresponden a proteínas de tamaños de 180, 154, 141, 66, 45, 38 y 30 kDa. Finalmente las proteínas menos abundantes fueron de 84 y 71 kDa. En los CI de *A. thaliana* se observaron que las bandas más intensas correspondían a proteínas con tamaños estimados de 142, 55 y 24 kDa. Otras de menor intensidad de 100, 84, 68, 48 y 38 kDa; así como otras apenas perceptibles de 193, 167, 106, 33 y 29 kDa.

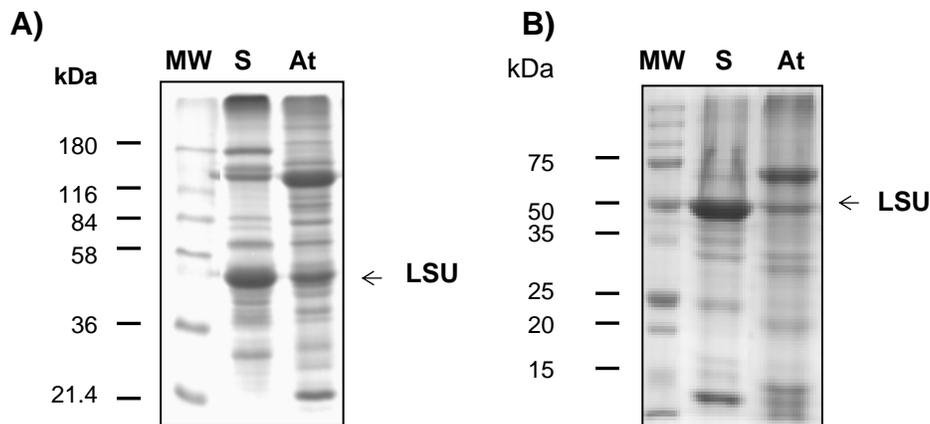


Figura 9. Extractos proteicos de cloroplastos intactos (A) y extractos de procesamiento (B), de *A. thaliana* (At) y espinaca (S). Las proteínas (20 µg por carril) de ambos extractos se separaron en geles SDS-PAGE al 10% y 15%, respectivamente, teñidos con azul de Coomassie. LSU) subunidad grande de RuBisCO.

En el EP de espinaca se observó que las proteínas más abundantes fueron la LSU (55 kDa) y la SSU (14 kDa) y las de mediana intensidad fueron proteínas de 69, 42, 35, 33, 24, 17 y 15 kDa. En el EP *A. thaliana* se observaron diferencias con respecto al de espinaca, ya que la banda más intensa correspondía a una proteína de 67 kDa, las de mediana intensidad a proteínas de 55, 14, 12 y 10 kDa y las menos abundantes a proteínas de 33, 26 y 21 kDa. Por lo que podemos decir que las proteínas que componen ambos extractos comparten algunas muy características, aunque existen diferencias en otras en cuanto a tamaño y abundancia.

7.4. Patrones de procesamiento de las diferentes fracciones obtenidas en la purificación del EP de *A. thaliana*.

A fin de monitorear la actividad de procesamiento de RNA en las diferentes fracciones durante el proceso de purificación del EP de *A. thaliana*, se realizaron ensayos de procesamiento *in vitro* empleando el transcrito radiactivo At3'psbA. Con la fracción proteica obtenida de los CI lisados se observó la aparición de distintas bandas, de tamaño más pequeño que el substrato, a partir de los 10 min del ensayo. El tamaño constante de estas bandas, durante el tiempo que duró el ensayo, sugiere la presencia de una actividad endonucleolítica. En las fracciones correspondientes a los sobrenadantes SN1 y SN2 se observa degradación del substrato, más evidente en el SN2. El SN1 proviene de la centrifugación de los CI lisados, mientras que el SN2 de la centrifugación de la primera precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. La actividad de procesamiento de la fracción EP produjo dos bandas claramente presentes desde los 5 min de reacción. Sin embargo, estos productos no son estables a los 60 min (Fig. 10). De estos resultados podemos concluir que existe una actividad de procesamiento de los 3'UTR en la fracción EP y que tanto en las fracciones SN1 como SN2 no se detectó procesamiento, sino más bien actividades endo y exonucleolíticas.

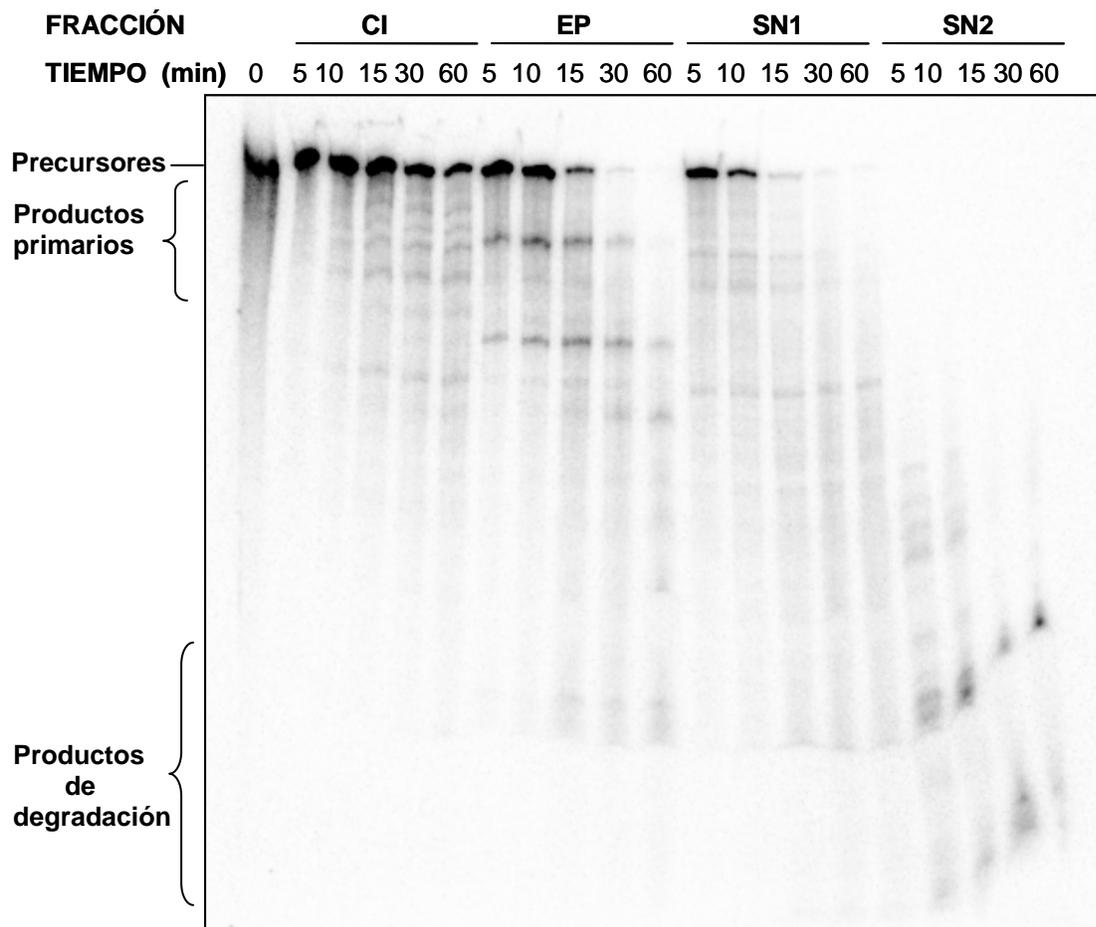


Figura 10. Autorradiografía de un gel desnaturalizante donde se separan los productos de procesamiento de At3'psbA con diferentes fracciones de la purificación del EP de *A. thaliana*. Cloroplastos intactos lisados (CI), extracto de procesamiento (EP), sobrenadantes provenientes de la purificación del EP: (SN1) y (SN2).

7.5. Interacciones *in vitro* de los diferentes 3'UTRs con proteínas de unión a RNA del cloroplasto

La homología entre las proteínas de unión a RNA de los EP de *A. thaliana* y espinaca fue analizada por ensayos de entrecruzamiento con luz ultravioleta en la que se compararon los patrones de unión de las proteínas de ambos extractos que se unían a los diferentes 3'UTR analizados.

Los patrones de unión de las proteínas del EP de espinaca con los mRNA de So3'psbA y At3'psbA son muy semejantes, a ambos transcritos se unen proteínas con tamaños estimados de 53, 17 y 15 kDa, pero una proteína de 26 kDa se une sólo al So3'psbA, mientras

que al At3'psbA se une una proteína de 23 kDa (Fig. 11, ver autorradiografía, carriles So3'psbA/EP E y At3'psbA/EP E). En el análisis de la unión de proteínas del EP de *A. thaliana* con So3'psbA se encontró que a este mensaje se unen proteínas de 53, 35, 33, 31, 28, 24, 19, 16 y 14 kDa, mientras que en el patrón de unión a At3'psbA se unen proteínas semejantes, aunque es evidente la ausencia de unión de las proteínas de 33, 31, 28 y 24 kDa. (Fig. 11, carriles So3'psbA/EP A y At3'psbA/EP A).

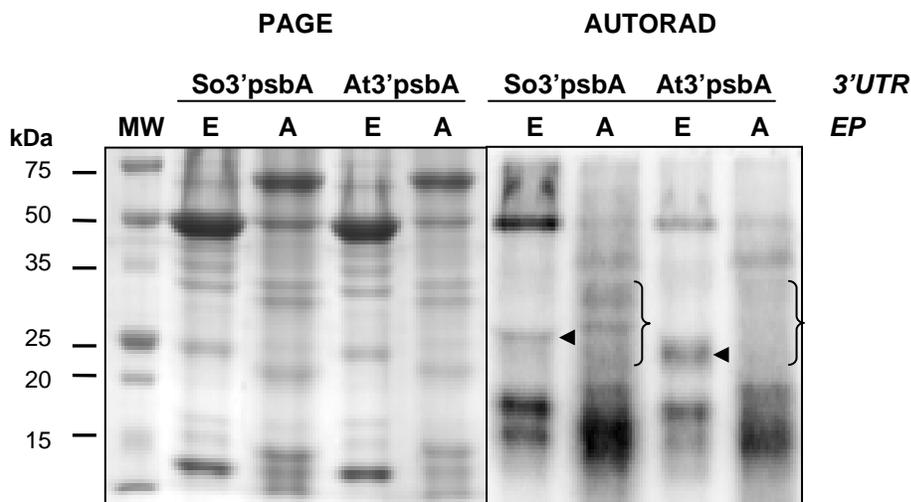


Figura 11. Autorradiografía y gel SDS-PAGE teñido con nitrato de plata donde se muestran los entrecruzamientos de las proteínas de los EP de espinaca y *A. thaliana* con los transcritos So3'psbA y At3'psbA. Se incubaron los 3'UTR marcados radiactivamente con los extractos proteicos (EP) de espinaca (E) y *A. thaliana* (A) por 10 min. Posteriormente las interacciones proteína-RNA se fijaron covalentemente dando un pulso con luz UV y tratando con RNasa A. Las muestras se analizaron en un gel SDS-PAGE al 10% teñido con nitrato de plata (panel izquierdo) y se hizo una autorradiografía (panel derecho). Las puntas de flecha y los corchetes señalan las diferencias más evidentes entre los EP entrecruzados.

El análisis de entrecruzamiento de los EP de espinaca y *A. thaliana* con los 3'UTR de *petD*, mostró patrones muy semejantes de los dos EP para cada 3'UTR. Así, al So3'petD se unen proteínas con tamaños estimados de 79, 57, 42, 38, 34, 32, 31, 29 y 26 kDa del EP de espinaca, mientras que en el EP de *A. thaliana*, además de estas proteínas, se observa una señal a 65 kDa y en vez de una de 42 y otra de 26 kDa, se observa una de 43 y una de 20 kDa. Las bandas notoriamente más intensas fueron la de 42/43, 38, 31 y 29 kDa en los dos EP (Fig. 12, ver carriles So3'petD/EP E y So3'petD/EP A). En el análisis de la unión al At3'petD se encontró que a este mensajero se unen proteínas de 120, 80, 43, 33, 31, 29, 23, 17, 14 y 12

kDa del EP de espinaca, mientras que en el EP de *A. thaliana* se observaron las mismas bandas para las proteínas grandes pero con una leve diferencia en los patrones de las proteínas pequeñas siendo de 16, 13 y 11 kDa. Las señales más evidentes fueron las de 43 y 23 kDa y las tres mas pequeñas (Fig. 12, carriles At3'petD/EP A y At3'petD/EP A).

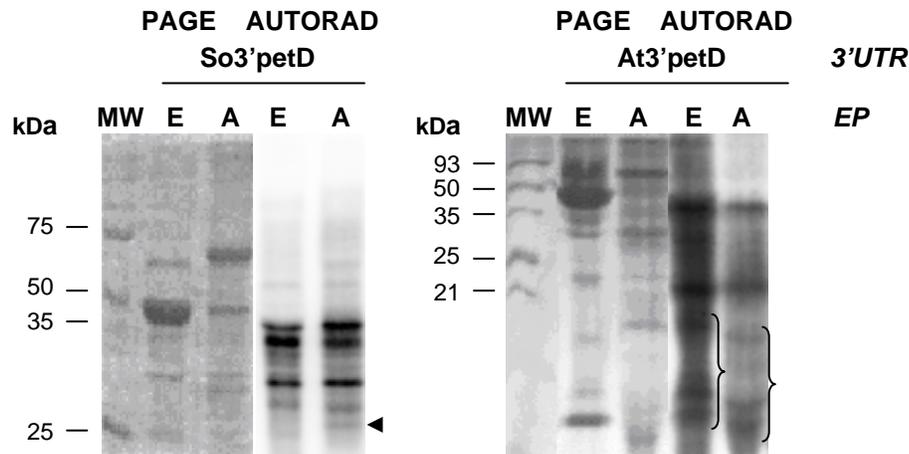


Figura 12. Autorradiografía y gel SDS-PAGE teñido con nitrato de plata donde se muestran los entrecruzamientos de So3'petD y At3'petD con los EP de espinaca y *A. thaliana*. Se incubaron los 3'UTR marcados radiactivamente con los extractos de espinaca (E) y *A. thaliana* (A) por 10 min. Posteriormente las interacciones proteína-RNA se fijaron covalentemente dando un pulso con luz UV y tratando con RNasa A. Las muestras se analizaron en un gel SDS-PAGE al 10% teñido con nitrato de plata y se hizo una autorradiografía. Las puntas de flecha y los corchetes señalan las diferencias más evidentes entre los EP entrecruzados.

En el caso de la unión de proteínas de los EPRC a los 3'UTR de *rbcL*, los patrones que se presentan parecen responder al tipo de 3'UTR y no al tipo de EP empleado en los entrecruzamientos. Así, podemos observar que, proteínas de tamaños semejantes se unen a So3'*rbcL* o a At3'*rbcL* independientemente del EP analizado. Para el So3'*rbcL*, los tamaños de las proteínas que pudieron detectarse en el entrecruzamiento con el EP de espinaca fueron de 78, 70, 60, 50, 38-36, 33-31, 28, 27 y 22 kDa, mientras que para el EP de *Arabidopsis* las proteínas observadas fueron de 100, 50, 43, 38-36, 33-31, 29 y 23 kDa. Fue evidente la menor intensidad de las bandas en el entrecruzamiento del EP de *A. thaliana* con el So3'*rbcL*, sin embargo no podemos argumentar que es debido a una menor afinidad de las RNP por el 3'UTR, aunque tampoco se puede excluir esta posibilidad (el ensayo no permite diferenciar

entre estas dos posibilidades) (Fig. 13, ver carriles So3'rbcL/EP E y So3'rbcL/EP A). Para el At3'rbcL las bandas observadas con el EP de espinaca fueron de 100, 67, 47, 38, 33, 31, 30, 28, 24, 20, 18, 16 y 12 kDa y para el EP de *Arabidopsis* se observaron las mismas proteínas con excepción de la de 100 kDa, pero con la presencia de una de 80 kDa. Las proteínas 33, 24 y 20 kDa de ambos EP poseen la misma intensidad con At3'rbcL. Mientras que las de 47, 31, 30, 28, 18, 15 y 10 kDa del EP de espinaca son más intensas con este transcrito (Fig. 13, carriles At3'rbcL/EP E y At3'rbcL/EP A).

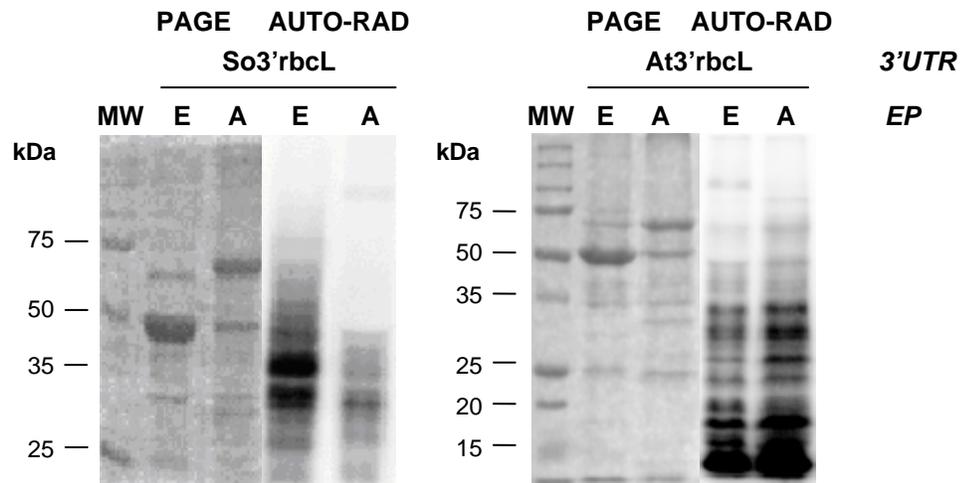


Figura 13. Autorradiografía y gel SDS-PAGE teñido con nitrato de plata donde se muestran los entrecruzamientos de So3'rbcL y At3'rbcL con los EP de espinaca y *A. thaliana*. Se incubaron los 3'UTR marcados radiactivamente con los extractos de espinaca (E) y *A. thaliana* (A) por 10 min. Posteriormente las interacciones proteína-RNA se fijaron covalentemente dando un pulso con luz UV y tratando con RNasa A. Las muestras se analizaron en un gel SDS-PAGE al 10% teñido con nitrato de plata y se hizo una autorradiografía.

7.6. Patrones de procesamiento de los EP de espinaca y *A. thaliana*

Se caracterizó la actividad de procesamiento de RNA *in vitro* de los EP de *A. thaliana* y espinaca, usando como sustratos los 3'UTR marcados radiactivamente de los genes *psbA*, *petD* y *rbcL* tanto de espinaca como de *A. thaliana*. Después de los tiempos indicados de incubación, se detuvo la reacción y el RNA se separó en geles desnaturalizantes de poliacrilamida-urea y se analizó por autoradiografía.

A fin de hacer la comparación entre los patrones de procesamiento de un extracto y

otro, se hicieron los ensayos de procesamiento con cada 3'UTR y su respectivo extracto y los experimentos complementarios en los que se emplearon los 3'UTR de una especie y el EP de la otra especie. El control mostró que el mRNA se mantenía estable en ausencia de las endo y exonucleasas del EP y que el procesamiento a observar es sólo producto de éstas y no de una contaminación de RNAsas. En el procesamiento por el EP de espinaca del So3'psbA se esperaba un producto de procesamiento de 211 nt, en el procesamiento de So3'petD, un producto de 156 nt y en el de So3'rbcL, se esperaba un producto de 227 nt (Fig. 14). Para los dos primeros transcritos los productos obtenidos de la reacción *in vitro* corresponden a lo esperado, aunque en el caso de So3'psbA la banda observada fue muy tenue. Solamente en el caso de So3'rbcL el producto formado posee un tamaño de aproximadamente 190 nt, lo cual es inferior al esperado. Esto podría deberse a un corte endonucleolítico incorrecto para procesamiento, dentro de la estructura tallo-asa, en una región rica en AU que está entre los nt 8 y nt 16 de esta estructura. Los productos de procesamiento de estos tres 3'UTR no son estables a 60 min. Al utilizar los transcritos de So3'petD y So3'rbcL para analizar el procesamiento *in vitro* del EP de *A. thaliana*, observamos no solo bandas muy tenues correspondientes a los productos de tamaño esperado, sino también la formación de varios productos con tamaños menores, que no son estables después de 5 min. En el caso de So3'psbA se puede observar una banda muy tenue correspondiente al producto esperado. Sin embargo, el producto mayoritario y estable hasta 1 h, es de un tamaño inferior a 211 nt, que era el esperado. Esto indica que el EP de *Arabidopsis* fue capaz de procesar los transcritos de espinaca en el sitio correcto, pero que estos productos no fueron estables y fueron también cortados en otros sitios.

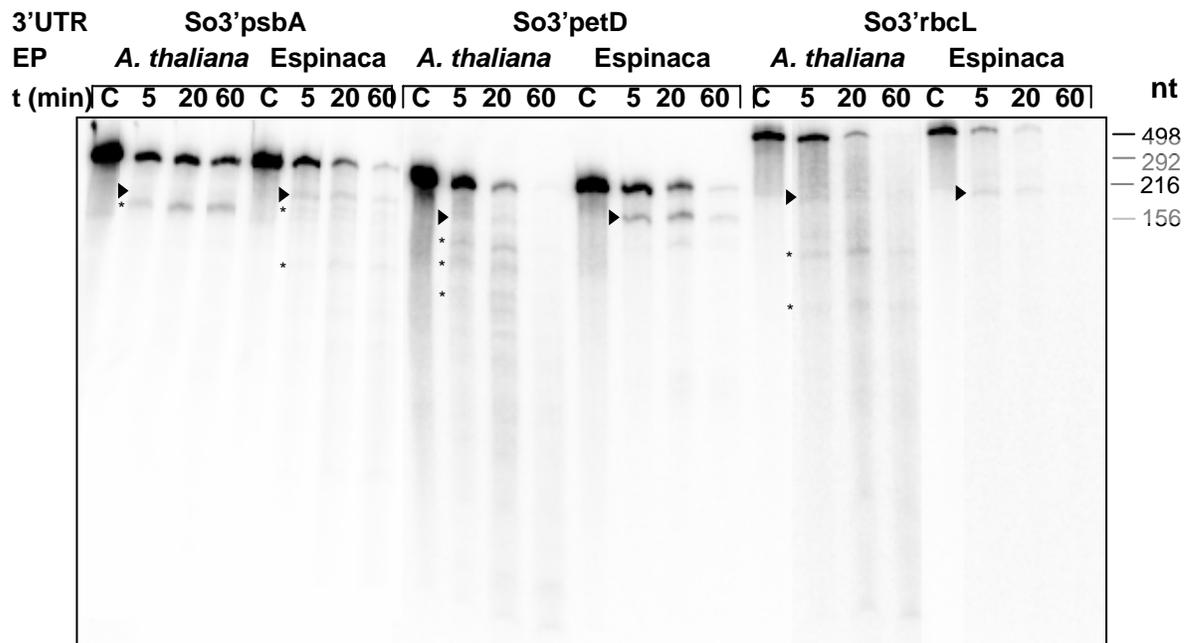


Figura 14. Autorradiografía de un gel desnaturalizante donde se separan los productos del procesamiento de los extremos 3'UTR de espinaaca con extractos de procesamiento de RNA de cloroplastos de *Arabidopsis* y espinaaca. Los precursores radiactivos (2,000 cpm/reacción) sintetizados por transcripción *in vitro* son incubados con los EP de espinaaca y *A. thaliana* (20 µg) a 25°C por 5, 20 y 60 min. C) Control negativo: precursor sin EP incubado a 25°C por 60 min. Los productos fueron separados en un gel de poliacrilamida-urea que finalmente se expuso a una placa radiográfica. Las puntas de flecha señalan los productos esperados, los asteriscos muestran otros productos de procesamiento/degradación.

En el caso de los ensayos de procesamiento de los 3'UTR de *A. thaliana* con el EP de espinaaca, At3'petD y At3'rbcl fueron procesados correctamente, generando productos con los tamaños esperados de 226 y 209 nt respectivamente. En el caso de At3'psbA se observa la formación de varios productos de tamaño inferior al esperado. Estos productos no son estables después de 5 min.

En el análisis de procesamiento de los transcritos de *Arabidopsis* con el EP de *A. thaliana*, observamos la presencia de bandas muy tenues correspondientes al sitio de procesamiento correcto para los transcritos At3'petD y At3'rbcl. Este extracto genera varios productos que son inestables después de 5 min. Para el procesamiento de At3'psbA se

esperaría un producto maduro de 170 nt, mientras que el segmento restante (223 nt), sería susceptible a ataque exonucleolítico. Sin embargo, en el caso de At3'psbA se observa la formación de dos productos mayoritarios, uno con el tamaño esperado de 170 nt y otro que podría corresponder al segmento de 223 nt, ambos estables después de 1 h. Se podría sugerir que la estabilidad del producto de 223 nt en el ensayo *in vitro* puede ser por la presencia de estructuras secundarias que lo protejan del ataque de endo y exonucleasas, quizá por la unión de RNP a ese fragmento (Fig. 15).

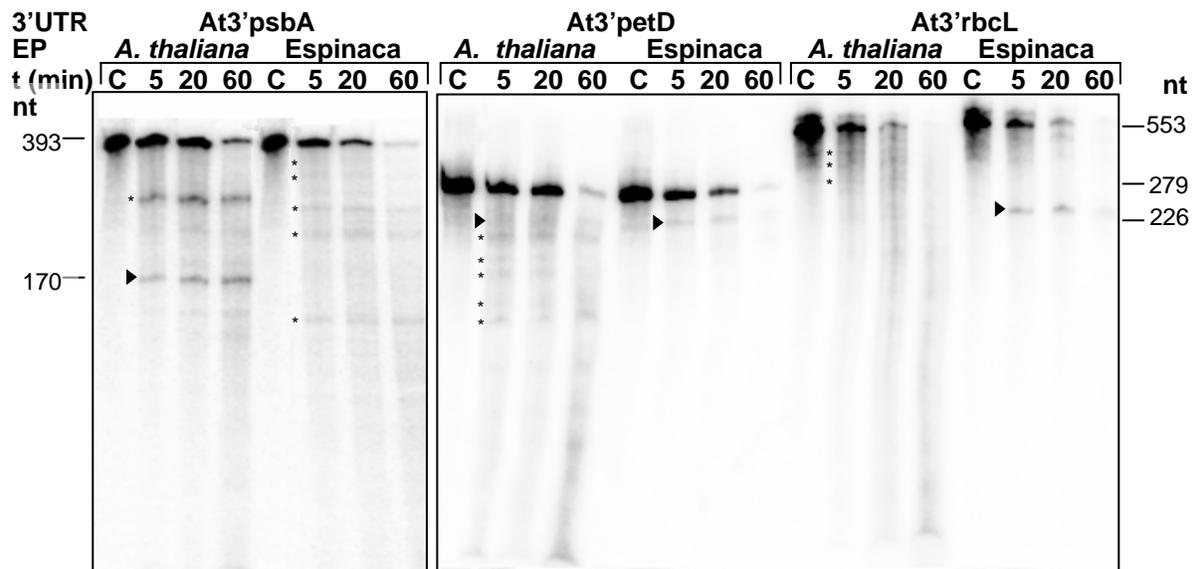


Figura 15. Autorradiografía de un gel desnaturante donde se separan los productos del procesamiento de extremos los 3'UTR de *A. thaliana* con extractos de procesamiento de RNA de cloroplastos de *Arabidopsis* y espinaca. Los precursores radiactivos (2,000 cpm/reacción) sintetizados por transcripción *in vitro* son incubados con los EP de espinaca y *A. thaliana* (20 µg) a 25°C por 5, 20 y 60 min. C) Control negativo: precursor sin EP incubado a 25°C por 60 min. Los productos (señalados con asteriscos) fueron separados en un gel de poliacrilamida-urea y finalmente se expuso a una placa radiográfica. Las puntas de flecha señalan los productos esperados, los asteriscos señalan otros productos de procesamiento/degradación.

7.7. Efecto de la concentración de iones Mg^{2+} en el procesamiento de los 3'UTR

La concentración de Mg^{2+} , Mn^{2+} y K^+ presentes en el ensayo de procesamiento de RNA *in vitro* es determinante en el procesamiento de los mensajeros cloroplásticos de

espinaca (Stern y Gruissem, 1987; Stern y Gruissem, 1989), no se tiene ningún dato del efecto que pudieran tener estos iones en el sistema con *A. thaliana*, se pensó que tal vez los patrones de procesamiento observados con el EP de *A. thaliana* podrían deberse a que las concentraciones de alguno de estos iones no fuera la adecuada para realizar el procesamiento correcto. Por lo tanto, se realizaron ensayos de procesamiento variando las concentraciones de Mg^{2+} y K^+ . Originalmente el Mg^{2+} se encuentra a 12.5 mM y el K^+ a 60 mM. Empleando At3'psbA como precursor, se encontró que al aumentar la concentración de iones Mg^{2+} de 12.5 mM hasta 50 mM se inhibe el procesamiento, mientras que al aumentar la concentración de 60 mM a 120 mM del K^+ se generaban más productos debido a una posible actividad endonucleolítica inespecífica sobre los 3'UTR (Fig. 16).

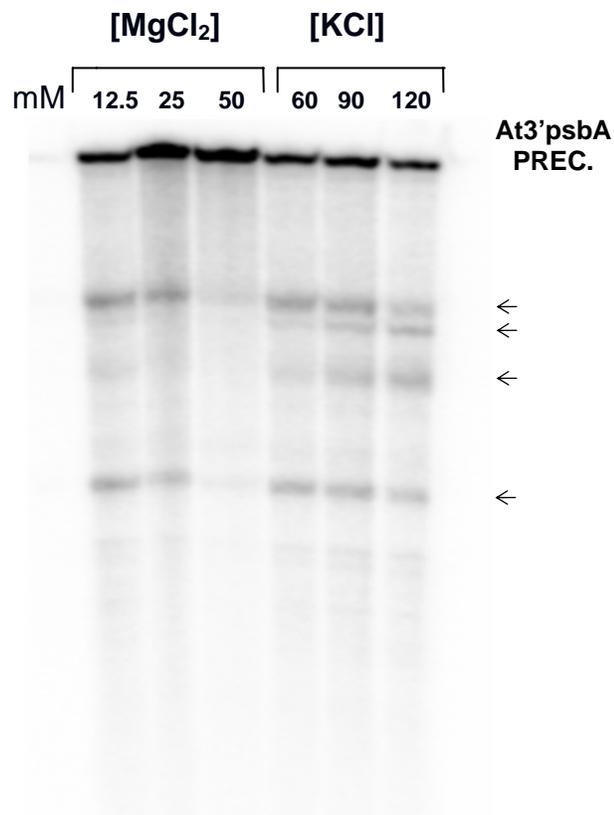


Figura 16. Autorradiografía de un gel desnaturalizante donde se separan los productos del procesamiento de At3'psbA a diferentes concentraciones de MgCl₂ y KCl. El EP de *A. thaliana* y el 3'UTR de *psbA* se incubaron por 20 min. Los diferentes productos están marcados por flechas. El RNA fue separado en un gel de poliacrilamida-urea y analizado a través de una autorradiografía.

8. DISCUSIÓN

8.1. Semejanza de los 3'UTR de mRNA de espinaca y *Arabidopsis*

Diversos estudios han demostrado que la estabilidad de los mRNA es un factor importante en la regulación de la expresión de ciertos genes, tanto en procariotes como en eucariotes (Stern y Gruissem, 1989). Algunos de los mRNA cloroplásticos poseen secuencias repetidas invertidas (IR) en su extremo 3' no traducible (3'UTR), que pueden plegarse en estructuras tallo-asa (Rott *et al.*, 1998). Se ha demostrado que la presencia de esta estructura está relacionada con la estabilidad de los mRNA (Stern y Gruissem, 1989; Stern *et al.*, 1989). Sin embargo, la estabilidad de los mRNA no es determinada únicamente por esta estructura, ya que su energía libre no correlaciona con su estabilidad *in vitro* y con la acumulación de los mRNA correspondientes *in vivo* (Barkan y Stern, 1998), sino que la unión con elementos *trans*, es decir, proteínas de unión a RNA (RNP), está también involucrada.

En el presente trabajo se analizaron las secuencias de tres parejas de 3'UTR de mRNA de cloroplasto: *psbA*, *petD* y *rbcL*, de espinaca y *Arabidopsis thaliana*. El análisis de sus secuencias, así como del posible plegamiento que pueden presentar, mostró que mantienen una alta identidad en su región codificadora y la presencia de una estructura tallo-asa muy parecida tanto en secuencia como en tamaño y forma. Asimismo, este análisis nos permitió identificar posibles sitios de reconocimiento de endonucleasas (SRE) en las moléculas de *Arabidopsis*, basándonos en los reportados para espinaca. Una de las características de estos SRE es que son secuencias ricas en motivos AU. Se ha reportado que algunas se encuentran en una región no apareada, aunque otras se localizan en regiones apareadas de doble cadena.

8.2. Proteínas presentes en los CI y en los EP de espinaca y *A. thaliana*

La purificación de cloroplastos intactos de *A. thaliana* se realizó con base en un protocolo de aislamiento de cloroplastos fotosintéticamente activos (Somerville, *et al.*, 1981). En este protocolo, así como en el de espinaca, el aislamiento de cloroplastos intactos se realiza por gradientes de Percoll, que permiten diferenciar cloroplastos rotos de intactos, a través de la formación de dos bandas de diferente tamaño. La banda de cloroplastos intactos migra más que la de cloroplastos rotos, por ser más pesados. Ésto permite colectar solamente la fracción

de cloroplastos intactos, que servirá para la preparación del EP, partiendo así de una población completa de proteínas cloroplásticas.

La preparación del extracto de procesamiento (EP) de *Arabidopsis* se realizó con base en modificaciones del protocolo publicado para espinaca (Schuster y Gruissem, 1990). Este protocolo no ha sido probado previamente, por lo que ésta es la primera aproximación que se realiza para tratar de preparar un extracto de cloroplastos de *Arabidopsis*, con capacidad de procesamiento *in vitro* de los 3'UTR.

En el análisis de los patrones proteicos por PAGE-SDS de cloroplastos intactos, se pudo observar que la abundancia de las subunidades de la proteína Rubisco, LSU (55 kDa) y SSU (14 kDa) fue mayor en el extracto de cloroplastos de espinaca, que en el extracto de cloroplastos de *A. thaliana*. Mientras que una proteína de 67 kDa fue más abundante en el extracto de cloroplastos de *Arabidopsis* que en el de espinaca. Esta proteína probablemente corresponde a una apoproteína clorofílica de PSI (65-70 kDa) que ha sido reportada como muy abundante en extractos de chícharo (Berends *et al.*, 1985). Estas observaciones indican que a pesar de que las proteínas fotosintéticas son muy abundantes y conservadas, su cantidad no es la misma en las diferentes especies vegetales.

Los EP de espinaca y *A. thaliana*, analizados por PAGE-SDS y tinción con Coomassie, mostraron que aparentemente están constituidos por proteínas diferentes, compartiendo solo tres: LSU (55 kDa), SSU (14 kDa) y una de 33 kDa. Las proteínas más abundantes en el EP de espinaca fueron la LSU y la SSU; en tanto que en el EP de *A. thaliana* fue una proteína de 67 kDa. Sin embargo, aún cuando en estos geles se puede observar que aparentemente los EP poseen diferentes proteínas, sólo a través de la comparación de los patrones resultantes de los ensayos de entrecruzamiento con los 3'UTR, podremos determinar la presencia de proteínas semejantes que interaccionen con mRNA.

Con objeto de determinar si la fracción considerada como el EP de *Arabidopsis* era funcional y si las fracciones resultantes durante el proceso de purificación (CI, SN1 y SN2), no presentaban actividad de procesamiento, se analizaron todas estas fracciones, en ensayos de procesamiento *in vitro* empleando el 3'UTR de *psbA*. Este análisis, permitiría determinar si alguna de las proteínas necesarias para el procesamiento *in vitro*, se hubiera quedado en una de las fracciones resultantes del proceso de purificación. De este análisis concluimos que sólo la fracción EP realiza procesamiento de RNA *in vitro* y que las fracciones que no son el EP,

degradan el RNA. Por lo cual consideramos que fuimos capaces de purificar un extracto de cloroplastos con capacidad de procesar el 3'UTR de *psbA in vitro*.

8.3. Entrecruzamiento de los EP de espinaca y *A. thaliana* con los diferentes 3'UTR

Se ha descrito en espinaca, la participación de ciertas proteínas de unión a RNA, tales como las 100, 55, 33, 28 y 24 RNP, y la p67, necesarias para que se lleve a cabo el procesamiento correcto de los 3'UTR de *psbA* y *petD* (Stern y Gruissem, 1989; Hayes *et al.*, 1996). La 100 RNP (100 kDa) es una proteína homóloga de la polinucleótido fosforilasa (PNPasa) de *Escherichia coli*, esta proteína es una exo-ribonucleasa que degrada RNA a nucleósidos difosfato de manera procesiva en dirección 3' al 5' (Littauer y Soreq, 1982). La proteína p67 tiene actividad de unión a mRNA, ya que tiene un motivo PPR, además de un cierre de leucina involucrado en dimerización y puede unirse a sistemas de membranas, por lo que se ha postulado que podría estar interviniendo en el procesamiento de mRNA (Lahmy *et al.*, 2000). La 55RNP es una proteína que puede unirse 17 nt antes (en una secuencia AUUUAUU) y 2 nt después (en una secuencia AUUCAUU) del tallo-asa del extremo 3'UTR del gen *petD* (Hsu-Ching y Stern, 1991). Se ha propuesto que la unión de esta proteína antes del tallo-asa en el motivo rico en AU, podría evitar la degradación de los mensajeros, ya que esta secuencia es susceptible al ataque por endonucleasas (Stern y Gruissem, 1989; Hayes *et al.*, 1996). La 33 RNP es una proteína que al unirse a la base del tallo-asa (en los primeros 5 nt) del 3'UTR de *petD*, estabiliza la estructura secundaria del tallo-asa. Esta proteína también puede unirse después del tallo-asa, en la secuencia AUUCAUUAC (Hsu-Ching y Stern, 1991). A través de evidencia experimental se ha encontrado que las proteínas 100, 32, 31 y 28 RNP, no sólo se unen a motivos ricos en AU que se encuentran después de la estructura tallo-asa del 3'UTR de *petD*, sino también a múltiples sitios de unión en los mRNA de *psbA* y *rbcL* (Hsu-Cheng y Stern, 1991). Se demostró que tanto la 28RNP (Lisistky y Schuster, 1995) como la 24RNP (Loza-Tavera *et al.*, 2006) pueden ser fosforiladas *in vitro* por cinasas heterólogas, alterando su unión a RNA, lo que sugiere que la fosforilación puede ser un mecanismo para regular el procesamiento de los mRNA a los que se unen.

A través de los ensayos de entrecruzamiento por luz UV, se observó que en ambos EP se encontraban dos proteínas con un tamaño aproximado de 53 y 33 kDa que se unen a

At3'psbA y So3'psbA. Los patrones de unión del EP de *A. thaliana* mostraron que algunas proteínas con tamaños aproximados de 35, 24, 19, 16 y 14 kDa, se unían también a ambos transcritos. Interesantemente, a la fecha no se había reportado que en *Arabidopsis* que proteínas con tamaños de 33 y 24 kDa participaran en el procesamiento de los extremos 3'UTR; ni tampoco que proteínas de 23 y 16 kDa se unieran a los 3'UTR. Estas proteínas podrían corresponder a las homólogas descritas en espinaca (Hsu-Cheng y Stern, 1991). Estas últimas proteínas de 23 kDa y 16 kDa, en espinaca, se unían a lo largo del mRNA y después del tallo-asa de *psbA*, *petD* y *rbcL*, respectivamente (Stern *et al.*, 1989).

En el EP de espinaca se observaron dos proteínas de 34 y 33 kDa que se unían a At3'psbA y So3'psbA, mientras que otra de 26 kDa sólo se une a So3'psbA y una de 23 kDa a At3'psbA. De las proteínas de 35, 26, 23, 19 y 14 kDa no se tiene referencia de su participación en el procesamiento de los 3'UTR.

La unión de proteínas de ambos EP a los 3'UTR de *petD* parece depender del tipo de 3'UTR y no del tipo de EP empleado en los entrecruzamientos. En el análisis de la unión de So3'petD, se encontró que a este transcrito se unían proteínas de 79, 38, 34 y 32 kDa presentes en los EP de espinaca y *Arabidopsis*. Mientras que proteínas de 120, 80, 33 y 23 kDa (también en ambos extractos) se unían a At3'petD. Ninguna de las proteínas anteriormente mencionadas, salvo la 32 y 33 han sido relacionadas con el procesamiento de los 3'UTR. En el patrón de unión del EP de espinaca, se encontró que una proteína de 17 kDa solo se unía a At3'petD, mientras que otras de 57, 42, 29, 26, 14 y 12 kDa se unen únicamente a So3'petD. Esta proteína de 57 kDa podría corresponder a una de 55 kDa (anteriormente también se le había asignado un tamaño de 57 kDa) que reconoce específicamente motivos ricos en AU antes del tallo-asa del 3'UTR de *petD*, los cuales se mantienen altamente conservados en diferentes especies (Hsu-Ching y Stern, 1991). En el caso del EP de *A. thaliana* se encontró que proteínas de 43 y 31 kDa se unen a So3'petD y At3'petD. Mientras que proteínas de 20, 16, 13 y 11 kDa se unen a At3'petD y sólo una de 65 kDa (la cual podría corresponder a p67) a So3'petD.

En el caso de la unión de proteínas de los EP a los 3'UTR de *rbcL*, al igual que en el caso de *petD*, los patrones que se presentan responden al tipo de 3'UTR y no al tipo de EP empleado en los entrecruzamientos. Algunas proteínas de 100, 38, 33, 31 y 28 kDa presentes en los EP de espinaca y *A. thaliana* se unen a At3'rbcL y So3'rbcL. Estas proteínas (a

excepción de la de 38 kDa, de la cual no se tiene ningún reporte) podrían corresponder a la 100, 33, 31 y 28 RNP de espinaca. En ambos extractos se encuentran proteínas de 47, 24, 20, 18, 16 y 12 kDa que sólo se unen a At3'rbcl, mientras que otras de 50 y 56 kDa lo hacen con So3'rbcl.

En el EP de espinaca existen proteínas de 70, 60, 27 y 22 kDa que sólo se unen a So3'rbcl. En el caso del EP de *A. thaliana* hay una proteína de 67 kDa que se une a ambos transcritos. Esta proteína podría ser la homóloga de p67 en espinaca, que interviene en el procesamiento de mRNA y no se había reportado para *A. thaliana*. Existen también en este EP una proteína de 80 kDa que se une sólo a At3'rbcl. Esta proteína de 80 kDa, así como las de 47 kDa y 60 kDa, anteriormente mencionadas, podría pensarse que corresponden a las proteínas de unión a RNA descritas para *C. reinhardtii* (Zerges y Rochaix, 1998). Sin embargo, lo más probable es que estas proteínas no correspondan ya que éstas se encontraron asociadas a membranas de baja densidad (LDM) y fueron extraídas con detergente, lo cual no realizamos en este trabajo. En tanto que a So3'rbcl se unen únicamente proteínas de 29 y 33 kDa del EP de *A. thaliana*. Esto último es interesante, ya que en extractos de espinaca se han encontrado tres proteínas: la CSP29 (29 kDa), CSP41 (41 kDa) y la CSP55 (55 kDa) que forman un complejo, donde CSP41 tiene actividad de endonucleasa no específica y necesita interactuar con CSP55 (principalmente) y CSP29 para unirse al 3'UTR de *petD*. Este complejo interviene en la degradación más no en el procesamiento de los 3'UTR (Yang *et al.*, 1996).

Por lo anterior, podemos destacar que las proteínas de 100, 67, 41, 33, 32, 31, 28, 29, 24, 23 y 16 kDa presentes en el EP de *A. thaliana* y que se unen a los 3'UTR, podrían corresponder a sus homólogas de espinaca relacionadas con el procesamiento o estabilidad de los 3'UTR. Sin embargo, no se observa la presencia de alguna que corresponda a la 55 RNP, la cual evita la degradación de los mRNA. Además, también se observa la presencia de proteínas de 120, 80, 50, 53, 47, 43, 38, 35, 34, 20, 18, 13 y 11 kDa, de las cuales no se tiene referencia de que participen en el procesamiento de los 3'UTR.

De manera general podemos decir que las proteínas de unión a RNA de cloroplastos de *A. thaliana* se dividen en cuatro grupos: las que se unen de manera específica a At3'psbA y So3'psbA, una de 53 kDa; las específicas para At3'petD, de 13 y 11 kDa; las específicas para So3'rbcl y At3'rbcl, una de 67 kDa (probablemente la p67) y las que se unen a diferentes

mensajeros de una u otra especie, 120, 100, 80, 65, 56, 50, 47, 43, 38, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 29, 28, 24, 23, 20, 18, 16, 14 y 12 kDa.

En el caso del EP de espinaca, además de aquellas descritas que intervienen en el procesamiento de los 3'UTR, existen otras de 120, 80, 70, 60, 50, 38, 36, 34, 26, 23, 20, 17, 15 y 12 kDa que se unen a los extremos 3'UTR. De manera más específica, resalta el caso de las proteínas de 57, 42 y 14 kDa presenten únicamente en este EP, que solo se unen a At3'petD, mientras que las de 100 y 28 kDa (presentes en ambos extractos), se unen solo a At3'rbcl y So3'rbcl.

8.4. Patrones de procesamiento de los 3'UTR por los EP de espinaca y *A. thaliana*

Con base en los resultados obtenidos en los ensayos de procesamiento, podemos decir que el EP de espinaca posee todos los factores necesarios en la concentración adecuada para el correcto procesamiento de los 3'UTR de espinaca y *A. thaliana* probados en este trabajo. En el caso de So3'psbA, So3'petD, So3'rbcl, At3'petD y At3'rbcl, el EP de espinaca genera productos maduros (que corresponden con el término de la estructura tallo-asa más los nucleótidos del vector) con un tamaño de 211, 156, 227, 226 y 209 nt, respectivamente. Sin embargo, en este análisis, tales productos no son estables después de 1h. En experimentos realizados anteriormente en nuestro laboratorio, se ha observado que los productos de So3'psbA y So3'petD coinciden con el término de la estructura tallo-asa y son estables después de 1h (datos no publicados). En contraste, el EP de *A. thaliana* genera varios productos de tamaño inferior al esperado, con los mRNA mencionados anteriormente. Solo en el caso de At3'psbA y So3'psbA mRNA, este EP los procesa correctamente, generando productos de 170 y 211 nt, respectivamente. Sin embargo, el producto de 211 nt de So3'psbA no fue estable después de 1 h; mientras que para At3'psbA no sólo se genera el producto de 170 nt, sino también otro de 223 nt. Este fragmento suponemos que corresponde al resto del 3'UTR que se empleó como sustrato en el ensayo. La estabilidad observada en este fragmento podría ser debida a la presencia de estructuras secundarias de tipo tallo-asa observadas en la secuencia y que podrían unir RNP que las protegerían de la degradación.

En resumen, a través de estos ensayos de procesamiento, así como de los ensayos de entrecruzamiento, podríamos decir que a pesar de que observamos la presencia de proteínas

que pudieran ser las homólogas de algunas RNP de espinaca (100 RNP, 55 RNP, 33RNP, 31RNP, 28RNP, 24RNP, CSP55, CSP 47, CSP29 y p67), en el EP de cloroplastos de *A. thaliana* purificado en este trabajo, no existen todas las proteínas indispensables (algunas RNP específicas para los diferentes mensajes) o no se encuentran en la cantidad necesaria, para el correcto procesamiento *in vitro* de los mRNA analizados en este trabajo. Interesantemente, casi todos los mensajes (a pesar de no ser estables después de 1 h) son procesados adecuadamente con el EP de espinaca, no así con el EP de *A. thaliana*. Por lo que se deduce que a pesar de tener estructuras tallo-asa semejantes en sus extremos 3', éstas no son protegidas de la misma manera a fin de evitar su degradación.

En cuanto al efecto de la concentración de iones Mg^{2+} y K^+ en el procesamiento del EP de *A. thaliana*, se observó que éste era negativo, ya que al aumentar la concentración inicial de K^+ [60 mM] a 60 o 120 mM se presentaba una actividad endonucleolítica inespecífica tal y como se ha reportado en espinaca (Stern y Grussem, 1989; Klaff y Grussem, 1991). Al aumentar dos y cuatro veces más la concentración de Mg^{2+} , se observó una inhibición del procesamiento del EP de *A. thaliana*. Por lo que quedó descartado que la concentración de estos dos iones fuera la causa del procesamiento incorrecto de los 3'UTR.

En extractos de espinaca a los cuales se les han inmunosubstraído algunas cpRNP, se ha observado que una vez hecho el corte endonucleolítico y al no existir las cpRNP encargadas de proteger al mRNA del gen *psbA*, los fragmentos de mRNA son poliadenilados y degradados de manera exonucleolítica (Sugita *et al.*, 2001). Experimentos similares realizados en tabaco muestran que uno de estos factores, la proteína CP33, al encontrarse disminuida diez veces con respecto a otras cpRNP, afecta la estabilidad de los mensajeros o pre-mRNA. Esto es debido a que la CP33 se une inicialmente a los mRNA y facilita la unión de otras cpRNP, que forman a su vez un complejo estable cpRNP-mRNA, lo cual es inhibido cuando esta proteína es poco abundante o se encuentra ausente del extracto (Otha *et al.*, 1995).

En experimentos donde se inmunosubstraían las proteínas 28 y 24RNP del extracto de procesamiento de RNA de cloroplastos de espinaca, se observaron alteraciones en el correcto procesamiento *in vitro* del 3'UTR de *petD*, lo que sugirió fuertemente que son necesarias para su correcto procesamiento (Hayes *et al.*, 1996). En estudios en *C. reinhardtii* se ha determinado que la proteína de unión a RNA: RB63, está involucrada en la estabilidad, en la traducción y en otros procesos de regulación post-transcripcional. Esta proteína se encuentra

en las membranas de baja densidad (LDM) de los tilacoides (Nickelsen *et al.*, 2002). Las fracciones empleadas en estos ensayos (que contenían sistemas de membranas) fueron tratadas con algunos detergentes como el Tritón X-100, a fin de poder extraer las proteínas de unión a RNA. En nuestro trabajo, no realizamos ninguna extracción con detergentes, por lo que algunas proteínas necesarias en el procesamiento de los 3'UTR y en otros mecanismos de regulación post-transcripcional pudieron quedarse en los sistemas de membranas. Por lo anterior consideramos que es necesario ajustar las condiciones de purificación del EP (quedando descartada la concentración de iones Mg^{2+} y K^+), a fin de obtener las proteínas de 100-24 kDa que permitan poder llevar a cabo el correcto procesamiento *in vitro*. Para esto será necesario monitorear las diferentes fracciones durante la purificación, preferentemente por réplica en Western con anticuerpos específicos para las proteínas de interés. Ésto permitirá también identificar adecuadamente a las proteínas presentes en el EP. Asimismo, se podrían utilizar otros pasos de purificación que permitan eliminar proteínas que no participan en el procesamiento, como las de la RUBISCO (55 y 14 kDa) que son muy abundantes, y la proteína de 67 kDa observada en el EP de *Arabidopsis*, o emplear cromatografía de afinidad para proteínas de unión a RNA, lo cual ha reportado ser un método eficiente (Sugita y Sugiura, 1996).

9. CONCLUSIONES

- ✂ El E.P. de *A. thaliana* posee capacidad limitada de procesar los extremos 3'UTR de sus mensajeros, ya que sólo procesa el 3'UTR de At3'psbA, debido probablemente a la ausencia de proteínas específicas para cada mensajero o por la concentración baja de algún factor indispensable en el correcto procesamiento de los 3'UTR de *A. thaliana*.
- ✂ En el EP de *A. thaliana* existen cuatro grupos de proteínas de unión a RNA: las que se unen de manera específica a At3'psbA y So3'psbA, una de 53 kDa; las específicas para At3'petD, de 13 y 11 kDa; las específicas para So3'rbcL y At3'rbcL, una de 67 kDa (probablemente la p67) y las que se unen a diferentes mensajeros de una u otra especie, 120, 100, 80, 65, 56, 50, 47, 43, 38, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 29, 28, 24, 23, 20, 18, 16, 14 y 12 kDa.
- ✂ Algunas de las proteínas del EP de *A. thaliana* podrían ser las homólogas de la 100RNP, 55RNP, 33RNP, 31RNP, 28RNP, 24RNP, CSP55, CSP47, CSP29 y p67 de espinaca, que se ha reportado que participan en el procesamiento y degradación de los 3'UTR.
- ✂ En el EP de espinaca, además de aquellas proteínas descritas que intervienen en el procesamiento de los 3'UTR, existen otras de 120, 80, 70, 60, 50, 38, 36, 34, 26, 23, 20, 17, 15 y 12 kDa que se unen a los diferentes extremos 3'UTR. Solo proteínas de 57, 42 y 14 kDa se unen de manera específica a At3'petD.
- ✂ El EP de espinaca procesa correctamente los 3'UTR de So3'psbA, So3'petD, So3'rbcL, At3'petD y At3'rbcL, ya que genera productos maduros con tamaño que coincide con el término de la estructura tallo-asa que no son estables después de 1 h.
- ✂ Las secuencias de los 3'UTR de los mensajeros de *petD*, *psbA* y *rbcL* de espinaca y *A. thaliana*, presentan muy conservada su región codificadora, su estructura tallo-asa y la distancia del codón de paro al tallo-asa.

⌘ El efecto de la concentración de iones Mg^{2+} y K^+ en el procesamiento del EP de *A. thaliana* es negativo, ya que al aumentar la concentración inicial de K^+ [60 mM] a 90 o 120 mM se presentaba una actividad endonucleolítica inespecífica tal y como se ha reportado en espinaca.

10. APÉNDICE

Protocolos

Cultivo de *Arabidopsis thaliana*

Solución de Hoagland 8L (5X) [pH 5.2-5.4]

KNO ₃	24.26 g
Ca(NO ₃) ₂ * 4H ₂ O	37.79 g
MgSO ₄ * 7H ₂ O	19.72 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.64 g
EDTA	0.40 g
Micronutrientes 100X	400 mL

Micronutrientes 1L (100X)

MnCl ₂ *4H ₂ O	0.1780 g
H ₃ BO ₃	0.2840 g
ZnSO ₄ *7H ₂ O	0.0231 g
CuSO ₄ *5H ₂ O	0.0749 g
H ₂ MoO ₄ *H ₂ O	0.0017 g

Reacciones de ligación (sistema pGEM-T Easy)

Procedimiento

1. Centrifugar los tubos del vector pGEM-T Easy y del control, tomar del botón la cantidad necesaria de cada uno de ellos.
2. Agitar vigorosamente en el vórtex el amortiguador de ligación 2X, antes de usarse.
3. En un tubo Eppendorf mezclar 1µL del vector (50 ng), 5µL del amortiguador 2X de ligación, 1µL de DNA Ligasa (3U/µL) y 1.3 µL del producto de PCR y la cantidad de agua necesaria para ajustar al volumen final. Debe realizarse la ligación inmediatamente después de haberse amplificado el producto de PCR (sin purificar para evitar la pérdida de las colas de adeninas que poseen en sus extremos).
4. Mezclar la reacción con una micropipeta e incubar a 37°C a temperatura ambiente.
5. Transformar según el protocolo de transformación genética en células de *E. coli*.

Cultivo y preparación de células competentes por el método de RbCl₂.

Soluciones

Medio A

- 2 % Triptona
- 0.5 % Extracto de levadura
- 0.4 % MgSO₄
- 10 mM KCl [pH: 7.6 ajustado con KOH]

Solución B

- 10 mM RbCl₂
- 50 mM MnCl₂*4H₂O
- 30 mM CH₃COOK
- 10 mM CaCl₂

Solución C

- 10 mM RbCl₂
- 75 mM CaCl₂
- 10 mM MOPS
- 15% Glicerol

Procedimiento

1. Tomar 1 colonia de *E. coli* XL1-Blue e inocular en 5 mL de medio A (suplementado con ampicilina 100 µg/mL), incubar a 37°C durante toda la noche.
2. Preparar un nuevo cultivo con medio A en una dilución 1:50, incubar a 37°C con agitación constante.
3. A una densidad óptica (DO₅₅₀) de 0.3 (aprox. 1.5 h), tomar 1.5 mL de este cultivo y ponerlo en 30 mL de medio A tibio, hasta una DO₅₅₀ de (aprox. 3.0 h).
4. Incubar en hielo por 15 min y centrifugar a 5000 rpm por 5 min a 4°C.
5. Resuspender la pastilla en 8 mL de la solución B, incubar 2 h en hielo.
6. Centrifugar a 5000 rpm por 5 min a 4°C.
7. Resuspender en 1 mL de la solución C.

8. Almacenar las células en alícuotas de 50-100 μL en tubos Eppendorf y adicionar glicerol en un 15%, mezclar en el vortex, sumergir en N_2 líquido y guardar a -70°C .

Transformación genética en células de *E. coli*.

Soluciones

Medio LB (1L) [pH: 7.0, ajustado con NaOH]

Triptona	10 g
Extracto de Levadura	5 g
NaCl	10 g
H ₂ O c.b.p.	1 L

Medio SOC (100 mL)

Triptona	2.0 g
Extracto de levadura	0.5 g
NaCl 1M	1.0 mL
KCl 1M	0.5 mL
Mg ²⁺ 2M (MgCl ₂ y MgSO ₄) (estéril por filtración)	1.0 mL
Glucosa 2M	1.0 mL
H ₂ O c.b.p.	100 mL

Solución de Mg²⁺ 2M

MgCl ₂ *6 H ₂ O	20.33 g
MgSO ₄ *7 H ₂ O	24.65 g
H ₂ O c.b.p.	100 mL

Nota: Todas las soluciones deben prepararse con agua desionizada y posteriormente esterilizarse por autoclave. Asimismo, el material de cristalería debe ser esterilizado. La solución de Mg²⁺ 2M debe esterilizarse por filtración.

Procedimiento

1. Cuando se utilizan las células competentes, éstas se descongelan en hielo de 5-60 min.
2. Añadir el DNA con el que se desea transformar en un $\frac{1}{4}$ de volumen (máximo).
3. Incubar en hielo (0 °C) durante 30 min.
4. Colocar el tubo en un baño de 42 °C por 3 min, inmediatamente después se da un cambio térmico en hielo por 1 min.
5. Añadir 4 volúmenes de medio A (o SOC para las ligaciones en pGEM-T Easy) e incubar de 1-2 h a 37°C.
6. Centrifugar a 12,000 rpm por 5 min.
7. Disolver la pastilla en 100 μ L de medio LB.
8. Plaquear en cajas Petri con medio LB suplementado con ampicilina 100 μ g/mL y tetraciclina 20 μ g/mL.

Purificación y concentración de DNA (Fenol-Cloroformo)

Soluciones

10M Acetato de amonio

Fenol (saturado con amortiguador de fosfatos pH 7.0) /cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1)

Etanol al 100%

Procedimiento

1. Agregar a la solución de DNA a purificar, un volumen igual de fenol (saturado con amortiguador de fosfatos, pH: 7.0) /cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) en un tubo Eppendorf de 1.5 mL.
2. Agitar vigorosamente en el vortex por 10 seg y posteriormente centrifugar por 15 seg a temperatura ambiente.
3. Remover la fase acuosa (la de arriba) y transferirlo a otro tubo.
4. Agregar un $\frac{1}{4}$ de volumen de acetato de amonio 10 M a la solución de DNA. Mezclar brevemente en el vortex, dando unos golpecitos con los dedos al tubo.
5. Agregar de 2 a 2.5 volúmenes de etanol al 100% helado. Mezclar en el vortex y colocar el

tubo a -20°C por 30 min.

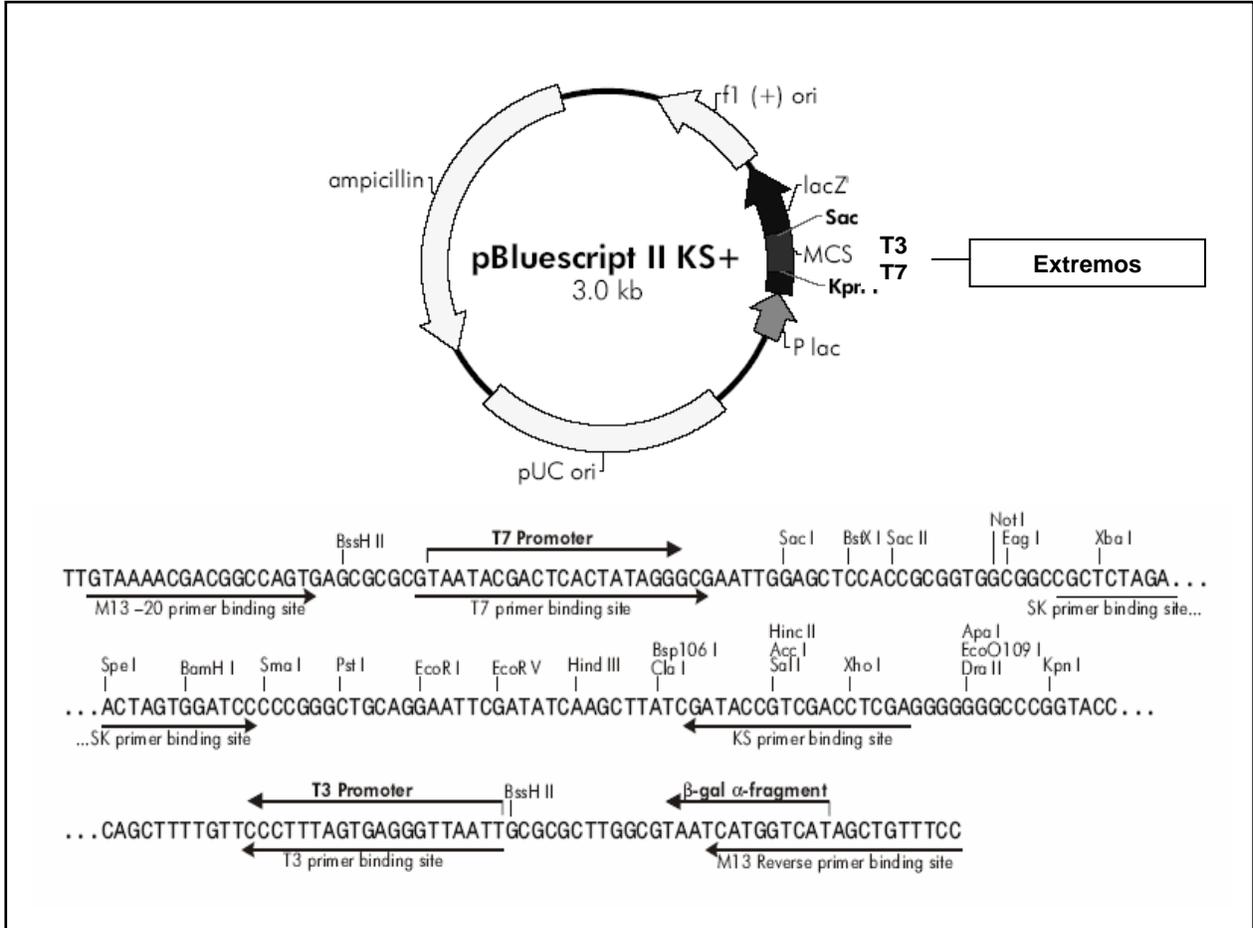
6. Centrifugar 5 min a velocidad máxima y eliminar el sobrenadante.
7. Agregar 1 mL de etanol al 70% a temperatura ambiente (si el DNA tiene tamaño menor a 200 bases, usar etanol al 95%), invertir varias veces.
8. Remover el etanol y dejar secar a temperatura ambiente.
9. Disolver la pastilla seca en un volumen apropiado de agua si va a ser utilizado para manipulaciones posteriores con amortiguadores específicos. Disolver en TE si va a ser almacenado indefinidamente a -20°C .

Ensayos de restricción

Procedimiento

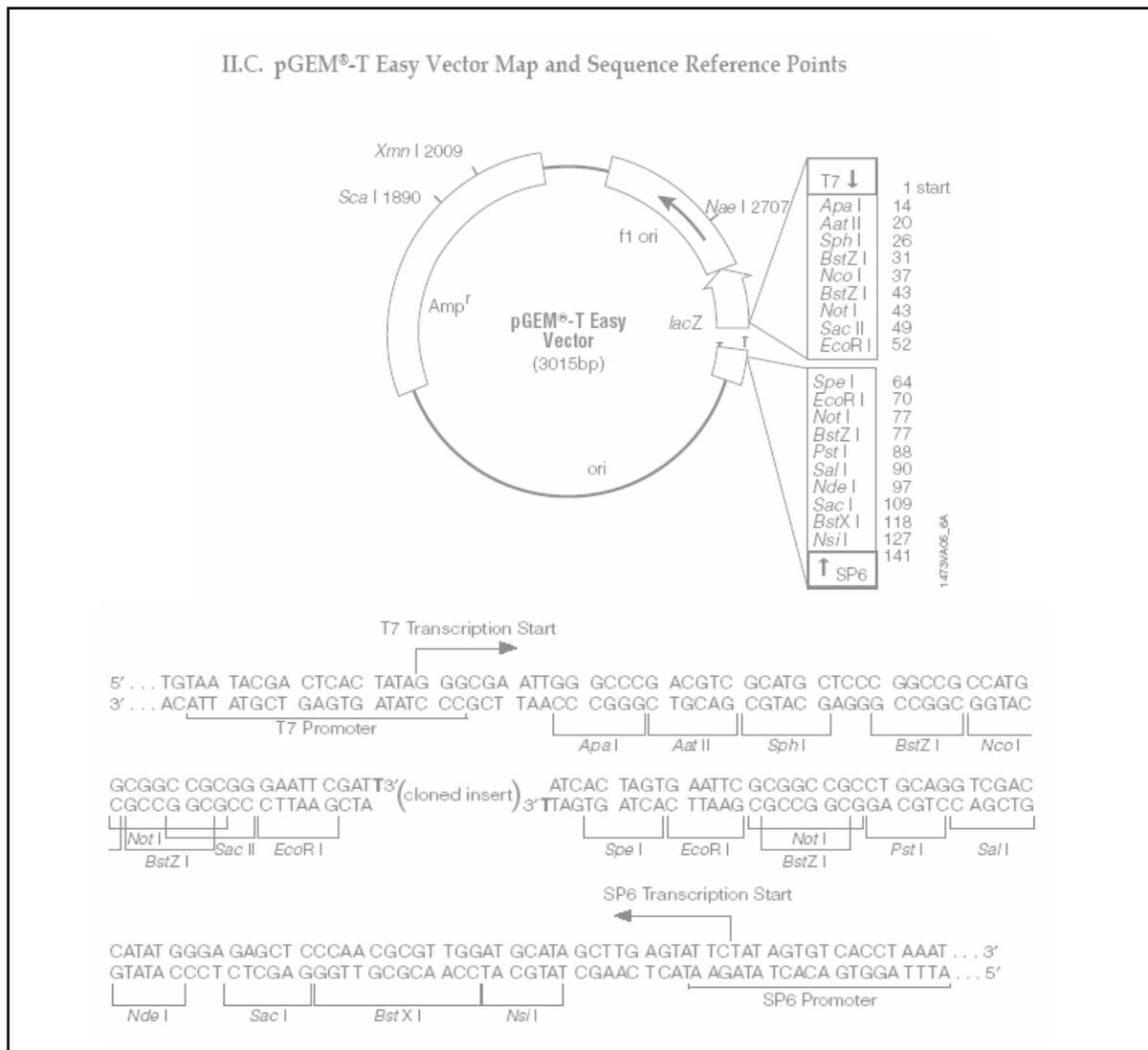
1. Purificar y cuantificar la muestra de DNA a 260 nm.
2. Se determina el volumen total de la reacción tomando el del DNA, enzima (que no debe exceder el 10% del volumen total) y el necesario para que el amortiguador quede a una concentración 1X. Agregar agua desionizada estéril si es necesario. Es necesario contar con la información del fabricante para diseñar la reacción de restricción.
3. Las enzimas de restricción y sus amortiguadores son muy delicados por lo que se deben usar rápidamente. El amortiguador se debe descongelar en hielo y la enzima debe de estar todo el tiempo a -20°C para evitar que se inactive.
4. En un tubo Eppendorf se agrega el DNA.
5. Adicionar el volumen necesario de amortiguador para que su concentración final sea 1X.
6. Agregar el volumen de agua necesario para ajustar la reacción.
7. Agregar la enzima (para cortar 1 μg de DNA se necesitan de 1-5 U de enzima, la actividad de cada enzima es de 10 U/ μL).
8. Incubar por 1.5 h a 37°C o a la temperatura óptima de la enzima en uso.

Mapas de los vectores de clonación de los 3'UTRs



Mapa del vector pBluescript KS (+/-). Este vector se empleó para clonar el 3'UTR del gen *rbcL* de *A. thaliana*, en los sitios *Bam*HI-*Kpn*I.

II.C. pGEM®-T Easy Vector Map and Sequence Reference Points



Mapa del vector pGEM T-Easy. Este vector se utilizó para la clonación de los 3'UTR de los genes *psbA*, *petD* de *A. thaliana* y *rbcL* de espinaca, donde las colas de adeninas de los productos amplificados se unen por complementariedad con las timinas que este vector posee artificialmente en sus extremos.

BIBLIOGRAFÍA

- Albá M., Pagés M. (1998) Plant proteins containing the RNA-recognition motif. *Trends Plant Sci.* 3: 15-21.
- Arenas-Huertero C. (2003) Unión de la 24RNP a diferentes 3'UTR de mensajes de cloroplasto de espinaca. Tesis de Maestría en C. Bioquímicas. Facultad de Química, UNAM.
- Audersik T., Audersik G. 1997. Biología, 4ª edición, Prentice Hall, México. 947 p.
- Baginsky S., Shteiman-Kotler A., Liveanu V., Yehudai-Resheff S., Bellaoui M., Settlege RE. Shabanowitz J., Hunt SF., Schuster G., Gruissem W. (2001) Chloroplast PNPase exists as a homo-multimer enzyme complex that is distinct from the *Escherichia coli* degradosome. *RNA.* 7: 1464–1475.
- Barkan A., Walker M., Nolasco M., Johnson D. (1994) A nuclear mutation in maize blocks the processing and translation of several chloroplast mRNA and provides evidence for the differential translation of alternative mRNA forms. *EMBO J.* 13, 3170–3181.
- Bar-Zvi D., Shagan T., Schindler U., Cashmore AR. (1992) RNP-T, a ribonucleoprotein from *Arabidopsis thaliana*, contains two RNP-80 motifs and a novel acidic repeat arranged in an α -helix conformation. *Plant Mol. Biol.* 20: 833-838.
- Bendich AJ. (1987) Why do chloroplasts and mitochondria contain so many copies of their genome? *Bio. Essays* 6: 279-82.
- Berends T., Kubicek Q., Mullet JE. (1986) Localization of the genes coding for the 51 kDa PSII chlorophyll apoprotein, apocytochrome b6, the 65–70 kDa PSI chlorophyll apoproteins and the 44 kDa PSII chlorophyll apoprotein in pea chloroplast DNA. *Plant Mol. Biol.* 6:125-134.
- Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-54.
- Grinnell BW., Wagner RR. (1984) Nucleotide sequence and secondary structure of VSV leader RNA and homologous DNA involved in inhibition of DNA-dependent transcription. *Cell.* 36:533-543
- Chen Q., Adams C., Usack L., Yang J., Monde R., Stern DB. (1995) An AU-rich element in the 3' untranslated region of the spinach chloroplast *petD* gene participates in

- sequence-specific RNA-protein complex formation. *Mol. Cell. Biol.* 15: 2010-2018.
- Cusack S. (1999) RNA-protein complexes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1: 66-73.
- Danon A., Mayfield SP. (1991) Light regulated translational activators: identification of chloroplast gene specific mRNA binding proteins. *EMBO J.* 13: 3993-4001.
- Deng, XW., Gruissem, W. (1987) Control of plastid gene expression during development: the limited role of transcriptional regulation. *Cell* 49:379–387.
- Deng XW., Gruissem, W. (1988) Constitutive transcription and regulation of gene expression in non-photosynthetic plastids of higher plants. *EMBO J.* 11: 3301-3308.
- Díaz-Mireles E. (2001) Fosforilación de la proteína de 24 kDa y su efecto en la afinidad al extremo 3' de petD de RNA de cloroplasto. Tesis de Maestría en C. Bioquímicas. Fac. de Química, UNAM.
- Fedoroff VN. (2002) RNA-binding proteins in plants: the tip of an iceberg? *Curr. Opin. Plant Biol.* 5:452–459
- Freire MA., Pages M. (1995) Functional characteristics of the maize RNA-binding protein MA16. *Plant Mol. Biol.* 4: 797-807.
- Fukami-Kobayashi K., Tomoda S., Go M. (1993) Evolutionary clustering and functional similarity of RNA-binding proteins. *FEBS Lett.* 335:289-293.
- Gruissem W., Barkan A., Deng XW., Stern, DB. (1988) Transcriptional and post-transcriptional control of plastid mRNA levels in higher plants. *Trends Genet.* 9: 258-63.
- Gutiérrez R., Machintosh G., Green P. (1999) Current perspectives on mRNA stability in plants: multiple levels and mechanisms of control. *Trends Plant Sci.* 4: 429-438.
- Hernández-Navarro A. (2000) Establecimiento de las condiciones para la inmunosustracción de la 24RNP de un extracto de procesamiento de RNA de cloroplastos de espinaca. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
- Hayes, R., Kudla, J., Schuster, G., Gabay, L., Maliga, P. And Gruissem, W. (1996) Chloroplast mRNA 3'-end processing by a high molecular weight protein complex is regulated by nuclear encoded RNA binding proteins.
- Hirose T., Sugiura M. (2004) Multiple elements required for translation of plastid *atpB* mRNA lacking the Shine–Dalgarno sequence. *Nucleic Acids Res.*, 32, 3503–3510.
- Hornstein E., Harel H., Levy G., Meyuhas O. (1999) Overexpression of poly(A)-binding

- protein down-regulates the translation or the abundance of its own mRNA. *FEBS Lett.* 2: 209-13.
- Hsu-Ching C., Stern DB. (1991) Specific binding of chloroplast proteins *in vitro* to the untranslated region of spinach chloroplast *petD* mRNA. *Mol. Cell. Biol.* 11: 4380-4388.
- Klaff P., Gruissem W. (1991) Changes in chloroplast mRNA stability during leaf development. *Plant Cell.* 3: 517-529.
- Kohchi T., Yoshida T., Komano T., Ohshima K. (1988) Divergent mRNA transcription in the chloroplast *psbB* operon. *EMBO J.* 4: 885-91.
- Kollmus H., Hentze, MW., Hauser H. (1996) Regulated ribosomal frameshifting by an RNA-protein interaction. *RNA.* 4: 316-23.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
- Lahmy S., Barne F., Derancourt J., Filipowicz W., Delseny M., Echeverria M. (2000) A chloroplastic RNA-binding protein is a new member of the PPR family. *FEBS Lett.* 480: 255-260.
- Levitan A., Trebitsh T., Kiss V., Pereg Y., Dangoor I., Danon A., (2005) Dual targeting of the protein disulfide isomerase RB60 to the chloroplast and the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 17: 6225-30.
- Li YQ., Sugiura M. (1990) Three distinct ribonucleoproteins from tobacco chloroplasts: each contains a unique amino terminal acidic domain and two ribonucleoprotein consensus motifs. *EMBO J.* 1990 10:3059-66.
- Li YQ., Sugiura M. (1991) Nucleic acid-binding specificities of tobacco chloroplast ribonucleoproteins. *Nucleic Acids Res.* 11: 2893-6.
- Li YQ., Ye LZ., Sugita M., Sugiura M. (1991) Tobacco nuclear gene for the 31 kd chloroplast ribonucleoprotein: genomic organization, sequence analysis and expression. *Nucleic Acids Res.* 11: 2987-91.
- Lisitsky I., Schuster G. (1995) Phosphorylation of a chloroplast RNA-binding protein changes its affinity to RNA. *Nucleic Acids Res.* 13: 2506-11.
- Littauer, UZ., Soreq, H. (1982) The regulatory function of poly(A) and adjacent 3' sequences in translated RNA. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 27:53-83.

- Lopato S., Kalyna M., Dorner S., Kobayashi R., Krainer AR., Barta A. (1999) atSRp30, one of two SF2/ASF-like proteins from *Arabidopsis thaliana*, regulates splicing of specific plant genes. *Genes Dev.* 8: 987-1001.
- Lopato S., Mayeda A., Krainer AR., Barta A. (1996) Pre-mRNA splicing in plants: characterization of Ser/Arg splicing factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 7:3074-9.
- Lorkovic ZJ., Barta A. (2002) Genome analysis: RNA recognition motif (RRM) and KH homology (KH) domain RNA-binding proteins from the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.* 30: 623–635.
- Loza-Tavera H., Vargas-Suárez M., Díaz-Mireles E., Torres-Márquez ME., González de la Vara LE., Moreno-Sánchez R., Gruissem W. (2006) Phosphorylation of the spinach chloroplast 24 kDa RNA-binding protein (24RNP) increases its binding to *petD* and *psbA* 3' untranslated regions. *Biochimie.* 9:1217-28.
- Ludevid MD., Freire MA., Gomez J., Burd CG., Albericio F., Giralt E., Dreyfuss G., Pages M. (1992) RNA binding characteristics of a 16 kDa glycine-rich protein from maize. *Plant J.* 6:999-1003
- Mathews DH., Sabina J., Zuker M., Turner DH. (1999) Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J. Mol. Biol.* 5: 911-40.
- Mayfield SP., Yohn CB., Cohen A., Danon A. (1995) Regulation of chloroplast gene expression. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 46:147–166.
- Meyerowitz EM. (1987) *Arabidopsis thaliana*. *Annu Rev Genet.* 21:93-111.
- Monde RA., Schuster G., Stern DB. (2000) Processing and degradation of chloroplast mRNA. *Biochimie.* 6-7: 573-82.
- Mullet JE., Klein R. (1987) Transcription and RNA stability are important determinants of higher plant chloroplast RNA levels. *EMBO J.* 6: 1571-1579.
- Mullet JE. (1993) Dynamic regulation of chloroplast transcription. *Plant Physiol.* 103: 309-313.
- Nagai K., Oubridge C., Ito N., Avis J., Evans P. (1995) The RNP domain: a sequence specific RNA-binding domain involved in processing and transport of RNA. *Trends Plant Sci.* 20:235-240.
- Nakamura T., Meierhoff K., Westhoff P., Schuster G. (2003) RNA-binding properties of

- HCF152, an *Arabidopsis* PPR protein involved in the processing of chloroplast RNA. *Eur. J. Biochem.* 20: 4070-81.
- Nakamura T., Ohta M., Sugiura M., Sugita M. (1999) Chloroplast ribonucleoproteins are associated with both mRNA and intron-containing precursor tRNAs. *FEBS Lett.* 3: 437-41.
- Neuhaus H., Scholz A., Link G. (1989) Structure and expression of a split chloroplast gene from mustard (*Sinapis alba*): ribosomal protein gene *rps16* reveals unusual transcriptional features and complex RNA maturation. *Curr. Genet.* 1: 63-70.
- Ni Z., Sun Q., Liu Z., Wang Z. (2000) Identification of a hybrid-specific expressed gene encoding novel RNA-binding protein in wheat seedlings using differential display of mRNA. *Mol. Gene. Genet.* 263:934-938.
- Nickelsen J. (2003) Chloroplast RNA-binding Protein. *Curr. Genet.* 43: 392-399.
- Nickelsen J., Link G. (1993) The 54 kDa RNA-binding protein from mustard chloroplasts mediates endonucleolytic transcript 3' end formation *in vitro*. *Plant J.* 4: 537-44.
- Ohta M., Sugita M., Sugiura M. (1995) Three types of nuclear genes encoding chloroplast RNA binding proteins (CP29, CP31 and CP33) are present in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 27: 529-539.
- Reddy MK., Nair S., Singh BN., Mudgil Y., Tewari KK., Sopory SK. (2001) Cloning and expression of a nuclear encoded plastid specific 33 kDa ribonucleoprotein gene (33RNP) from pea that is light stimulated. *Gene.* 24: 179-87.
- Rochaix JD. (2001) Posttranscriptional control of chloroplast gene expression. From RNA to photosynthetic complex. *Plant Physiol.* 1:142-4.
- Rodríguez-López CD. (2004) Interacción proteína-RNA en cloroplasto. Tesis de Maestría en C. Bioquímicas. Fac. de Química, UNAM.
- Rott R., Liveanu V., Drager R., Stern DB., Schuster G. (1998) The sequence and structure of the 3' untranslated regions of chloroplast transcripts are important determinants of mRNA accumulation and stability. *Plant Mol. Biol.* 36: 307-314.
- Ruf M., Kossel H. (1988). Structure and expression of the gene coding for the alpha-subunit of DNA-dependent RNA polymerase from the chloroplast genome of *Zea mays*. *Nucleic Acids Res.* 13: 5741-54.
- Rymarquis LA., Higgs DC., Stern DB. (2006) Nuclear suppressors define three factors that

- participate in both 5' and 3' end processing of mRNA in *Chlamydomonas* chloroplasts. *Plant J.* 46: 448-461.
- Sambrook J., Fritsch EF., Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY.
- Sato S., Nakamura Y., Kaneko T., Asamizu E., Tabata S. (1999) Complete structure of the chloroplast genome of *Arabidopsis thaliana*. *DNA Res.* 5:283-290.
- Schmitz-Linneweber C., Maier MR., Alcaraz JP., Cottet A., Herrmann GR., Mache R. (2001) The plastid chromosome of spinach (*Spinacia oleracea*): complete nucleotide sequence and gene organization. *Plant Mol. Biol.* 45: 307–315.
- Schuster G., Grussem W. (1991) Chloroplast mRNA 3' end processing requires a nuclear-encoded RNA-binding protein. *EMBO J.* 6: 1493-502.
- Smeekens S., Robinson C. (1990) Protein transport into and within chloroplasts. *Trends Plant Sci.* 15:73-76.
- Smith H. (1997) *Molecular Biology of Plant Cells*. UK.
- Somerville CR., Somerville SC., Ogren WL. (1981) Isolation of photosynthetically active protoplasts and chloroplasts from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci. Lett.* 21:89-96.
- Stern DB., Grussem W. (1987) Control of plastid gene expression: 3' inverted repeats act as mRNA processing and stabilizing elements, but do not terminate transcription. *Cell.* 51:1145–1157.
- Stern DB., Grussem W. (1989) Chloroplast mRNA 3' end maturation is biochemically distinct from prokaryotic mRNA processing. *Plant Mol. Biol.* 13: 615-25.
- Stern DB., Radwanski ER., Kindle KL. (1991) A 3' stem/loop structure of the *Chlamydomonas* chloroplast *atpB* gene regulates mRNA accumulation *in vivo*. *Plant Cell.* 1991 3: 285-97.
- Sugita M., Sugiura M. (1996) Regulation of gene expression in chloroplasts of higher plants. *Plant Mol. Biol.* 1-2: 315-26.
- Taylor W. (1989) Regulatory interactions between nuclear and plastid genomes. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 211-233.
- Toledo-Ortíz G. (1998) Estudio de la función de una proteína de 24 kDa que se une a RNA (24RNP) durante el proceso y estabilización de los mRNAs de cloroplasto. Tesis de Maestría en C. Bioquímicas. Fac. de Química, UNAM.

- Tonkyn JC., Gruissem W. (1993) Differential expression of the partially duplicated chloroplast S10 ribosomal protein operon. *Mol. Gen. Genet.* 1-2: 141-152.
- Westhoff P., Herrmann RG. (1988) Complex RNA maturation in chloroplasts. The *psbB* operon from spinach. *Eur. J. Biochem.* 171:551-564.
- Yang J., Stern DB. (1997) The spinach chloroplast endoribonuclease CSP41 cleaves the 3'-untranslated region of *petD* mRNA primarily within its terminal stem-loop structure. *J. Biol. Chem.* 19: 12874–12880.
- Ye LH., Li YQ., Fukami-Kobayashi K., Go M., Konishi T., Watanabe A., Sugiura M. (1991) Diversity of a ribonucleoprotein family in tobacco chloroplasts: two new chloroplast ribonucleoproteins and a phylogenetic tree of ten chloroplast RNA-binding domains. *Nucleic Acids Res.* 23: 6485-90.
- Ye L., Sugiura M. (1992) Domains required for nucleic acid binding activities in chloroplast ribonucleoproteins. *Nucleic Acids Res.* 23: 6275-9.
- Yohn CB., Cohen A., Danon A., Mayfield SP. (1996) Altered mRNA binding activity and decreased translational initiation in a nuclear mutant lacking translation of the chloroplast *psbA* mRNA. *Mol. Cell Biol.* 7: 3560-6.
- Yohn CB., Cohen A., Danon A., Mayfield SP. (1998) A poly(A) binding protein functions in the chloroplast as a message-specific translation factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 5: 2238-43.
- Yohn CB., Cohen A., Rosch C., Kuchka MR., Mayfield SP. (1998) Translation of the chloroplast *psbA* mRNA requires the nuclear-encoded poly(A)-binding protein, RB47. *J Cell Biol.* 2:435-42.
- Zerges W., Rochaix D. (1998) Low density membranes are associated with RNA-binding proteins and thylakoids in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell Biol.* 140:101-110.
- Zurawski G., Clegg MT. (1984) The barley chloroplast DNA *atpBE*, *trnM2*, and *trnV1* loci. *Nucleic Acids Res.* 5: 2549-59.