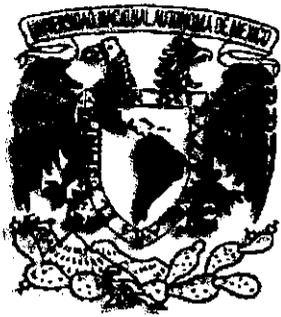


00551

8



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

UNAM
POSGRADO

DIRECCION GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE QUIMICA

299644

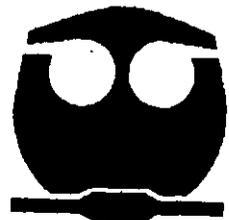
PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

FOSFORILACION DE LA PROTEINA DE 24
kDa (24RNP) Y SU EFECTO EN LA AFINIDAD
AL EXTREMO 3' DE *petD* DE RNA DE
CLOROPLASTO.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUIMICAS)
P R E S E N T A:
EDITH DIAZ MIRELES

MEXICO, D.F.

2001





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:	Dra. Rosario A. Muñoz Clares
Vocal:	Dr. Mario Rocha Sosa
Secretario:	Dra. Patricia León Mejía
Suplente:	Dra. María Eugenia Torres Márquez
Suplente:	Dra. Martha Patricia Coello Coutiño

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Ciudad Universitaria, Facultad de Química, Conjunto E
Departamento de Bioquímica, Laboratorio 105

Asesor del Tema: Dra. Herminia Loza Tavera

Sustentante: Q. Edith Díaz Mireles

A papá, mamá y Laura.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a las siguientes personas e instituciones:

Al CONACYT (proyecto 25199N), la Dirección General de asuntos de Personal Académico (DGAPA, proyecto IN205697) y la Pew Foundation por el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo.

Al CONACYT y a DGEP por la beca otorgada para realizar mis estudios de Maestría en Ciencias Bioquímicas (periodo Agosto de 1998 a Julio de 2000).

Al departamento de Bioquímica de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química por permitirme llevar a cabo este trabajo en sus instalaciones.

A todos los integrantes del Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología "Dr. Ignacio Chávez", en especial al Dr. Rafael Moreno por su asesoría para la realización de este proyecto.

Al departamento de Bioquímica de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Medicina, especialmente a la Dra. María Eugenia Torres por sus valiosos consejos y apoyo; así como por sus contribuciones y asesoría para llevar a cabo este trabajo.

A la Dra. Herminia Loza por sus enseñanzas y por haber formado parte de mi formación.

A la Dra. Rosario Muñoz y a la Dra. Miriam Altamirano por todas sus sugerencias y consejos para llevar a cabo este proyecto.

A Martín Vargas por su amistad, consejos y toda su ayuda y aportaciones para la realización de este trabajo

A mis compañeros de laboratorio: Sandy, Caty, Andre, Ale, Omar y César.

A Carlos Mújica y Homero Reyes por todas las veces que me sacaron de apuros.

A Elpidio García por su ayuda con la columna de exclusión molecular.

ABREVIATURAS	<i>i</i>
RESUMEN	<i>iii</i>
ANTECEDENTES	
I. Los plastidios	1
II. Características de los mRNAs cloroplásticos	3
III. Regulación de la expresión genética en cloroplastos	4
III: 1. Regulación post-transcripcional	5
III. 2. Procesamiento del extremo 3'UTR	6
III. 2. 1. Proteínas que interactúan con los extremos 3'UTR	6
III. 2. 2. Proteínas pequeñas de unión a RNA	10
III. 2. 2. 1. La 28 y la 24RNP de espinaca	10
III. 3. Fosforilación de proteínas que unen RNA	12
III. 4. Algunas cinasas de plantas.	14
HIPÓTESIS	16
OBJETIVOS	16
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	16
MATERIALES Y MÉTODOS	
1. Material Biológico	17
2. Producción y purificación de la 24RNP recombinante	18
2.1. Inducción en pequeña escala	19
2.5. Inducción a gran escala y purificación de la proteína 24RNP recombinante bajo condiciones nativas	19
3. Cuantificación de proteínas (Bradford)	20
4. Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante (PAGE-SDS)	21
5. Transferencia y Western Blot	24
6. Fosforilación de la 24RNP	26
7. Inmunoprecipitación de una actividad cinasa de cloroplastos de espinaca empleando un suero anti-CDPK de betabel y fosforilación de la 24RNP con esta preparación	27
8. Transcripción de RNA para procesamiento <i>in vitro</i>	28
9. Entrecruzamiento por luz ultravioleta (UV-crosslinking) de proteínas a RNA	30
10. Tinción de proteínas con plata	32
11. Electroforesis de RNA en gel de acrilamida	33
12. Aislamiento de cloroplastos de espinaca	34

RESULTADOS

1. Producción de 24RNP de espinaca recombinante	
a) Inducción a pequeña escala	39
b) Inducción de la 24RNP recombinante a gran escala y purificación de la proteína en condiciones nativas	40
c) Análisis de la 24RNP por exclusión molecular.	41
d) La 24RNP recombinante conserva sus propiedades de unión a RNA	42
2. Fosforilación de la 24RNP por una PKC inmunoprecipitada de cerebro de rata	42
3. Fosforilación de la 24RNP por una CDPK	43
4. Ensayo de entrecruzamiento por luz UV de la proteína recombinante 24RNP fosforilada y no fosforilada con el extremo 3'UTR de <i>petD</i>	
a) Utilizando cantidades crecientes de proteína	45
b) Utilizando cantidades crecientes de RNA	46
5. Inmunoprecipitación de una actividad cinasa a partir de cloroplastos intactos utilizando anti CDPK	48
6. La fosforilación de la 24RNP recombinante realizada por una actividad cinasa inmunoprecipitada de cloroplastos de espinaca también cambia sus propiedades de unión por el 3'UTR de <i>petD</i> .	50
7. La 24RNP se une en forma de monómero y de homodímero al extremo 3'UTR de <i>petD</i> .	50

DISCUSIÓN

1. Producción de la 24RNP de espinaca recombinante en <i>E. coli</i>	53
2. La 24RNP es fosforilada <i>in vitro</i> por cinasas dependientes de Ca^{2+}	54
3. Una actividad cinasa inmunoprecipitada de cloroplastos de espinaca es capaz de fosforilar a la 24RNP	55
4. La fosforilación cambia las propiedades de unión de la 24RNP de espinaca por el extremo 3'UTR de <i>petD</i>	56

CONCLUSIONES	58
--------------	----

PERSPECTIVAS	58
--------------	----

BIBLIOGRAFÍA	59
--------------	----

Abreviaturas

APS	Persulfato de amonio.
BSA	Albúmina de suero bovino.
CDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario.
Cpm	Cuentas por minuto.
Ci	Curie. 1
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
dNTPs	Deoxirribonucleótidos trifosfato.
D.O.	Densidad óptica.
DMP	Dimetil pimelimidato.
dpi	Puntos por pulgada.
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> .
EP	Extracto de procesamiento de cloroplastos de espinaca.
g	Gramos.
h	Horas.
IPTG	Isopropil-tio- β -D-galactósido.
IR	Secuencias invertidas repetidas.
kD	Kilodaltones.
kb	Kilobases.
L	Litro.
LB	Medio Luria-Bertoni.
M	Molaridad.
mA	Miliamperes.
mg	Miligramos.
mM	Milimolar.
min	Minutos.
mRNA	Ácido desoxirribonucleico mensajero.
nt	Nucleótidos.
³² P	Isótopo radiactivo de fósforo.

PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida.
pb	Pares de bases.
PBS	Solución salina de fosfatos.
RNA	Ácido ribonucleico marcado radiactivamente para experimentos de procesamiento <i>in vitro</i> .
RNA-H	Ácido ribonucleico marcado radiactivamente para experimentos de procesamiento <i>in vitro</i> .
RNasa	Ribonucleasa.
RNP	Ribonucleoproteína.
rpm	Revoluciones por minuto.
s	Segundos.
SDS	Dodecil sulfato de sodio
µg	Microgramos.
µL	Microlitros.
UTR	Región no traducida.

RESUMEN

La modulación de la estabilidad del RNA durante el desarrollo del cloroplasto es uno de los varios mecanismos mediante los cuales la expresión de los genes cloroplásticos es regulada (Mullet, 1988). Para definir el mecanismo del procesamiento de los extremos 3' del mRNA de cloroplastos y para determinar cómo se modula la estabilidad del mRNA durante el desarrollo de los cloroplastos, las proteínas que se unen al extremo 3' de RNA (RNPs) han sido identificadas y analizadas (Chen y Stern, 1991; Nickelsen y Link, 1989; Schuster y Gruissem, 1991). Se ha demostrado que una de estas proteínas, la 28RNP aislada de cloroplastos de espinaca, participa en el procesamiento de los extremos 3' de mRNA (Hayes *et al.*, 1996) y es fosforilada en su dominio ácido; dicha fosforilación cambia las propiedades de unión de la proteína por mRNA (Lisitski y Schuster, 1995).

Debido a que la 24RNP tiene una alta identidad con la 28RNP (57%) y además presenta secuencias consenso de fosforilación para PKC (proteín-cinasa dependiente de calcio), se decidió probar si la 24RNP era sustrato de dicha cinasa. En ensayos *in vitro* se encontró que la 24RNP puede ser fosforilada por una PKC inmunoprecipitada de cerebro de rata y también para una CDPK purificada de membrana plasmática de betabel. La CDPK (calcium-dependent protein kinase) es el equivalente en plantas de la PKC de mamíferos.

Para determinar si esta fosforilación afectaba las propiedades de unión de la 24RNP al RNA se llevaron a cabo experimentos de entrecruzamiento con luz U.V con el extremo 3'UTR de *petD*, los resultados indican que la unión al RNA de la 24RNP fosforilada ($B_{\text{máx}} = 19.55 \text{ dpi} / 45 \text{ fmol de } petD$) se reduce dos veces en comparación con la proteína no fosforilada ($B_{\text{máx}} = 8.53 \text{ dpi} / 45 \text{ fmol de } petD$). El comportamiento de unión de la proteína al RNA fue de tipo cooperativo con constantes de Hill de 2.5 y 3.9 para la 24RNP no fosforilada y fosforilada, respectivamente. Estos resultados sugieren que esta proteína se une al RNA como un oligómero de 4 y 6, dependiendo de si se encuentra defosforilada o fosforilada. En este trabajo se pudo determinar que la proteína al menos es capaz de formar dímeros al unirse con el RNA.

Resultados preliminares indican la existencia de una cinasa en cloroplastos de espinaca capaz de fosforilar a la 24 RNP.

ANTECEDENTES

I. Los plastidios

Los plastidios son organelos semiautónomos no diferenciados que contienen su propio material genético, así como la maquinaria transcripcional y traduccional requerida para su expresión. La mayoría de los genomas de los plastidios son circulares y tienen un tamaño que va de 120 -217 Kb. Estos organelos tienen de 22 a 30 copias de su genoma (Bendich, 1987) y contienen aproximadamente 135 genes, los cuales codifican productos que están relacionados con la fotosíntesis tales como proteínas del fotosistema I y II, la subunidad grande de la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa oxigenasa (Rubisco), ATP sintetasa, o productos involucrados en la expresión de éstos tales como proteínas ribosomales, RNAs ribosomales (rRNA), RNAs de transferencia (tRNA) y factores de iniciación y de elongación de la traducción (Mullet, 1993).

Los plastidios se encuentran presentes en todas las células vegetales, y en las hojas se diferencian a cloroplastos donde se lleva a cabo la fotosíntesis, mientras que en órganos donde es necesario almacenar almidón se transforman en amiloplastos. Sin embargo, estas dos funciones no son excluyentes, ya que los cloroplastos formarán almidón bajo condiciones fisiológicas adecuadas y la exposición a la luz de los órganos almacenadores de almidón hará que los amiloplastos formen membranas tilacoidales y clorofila. En ciertas partes de las plantas tales como flores, frutos y algunas partes de las hojas, los tilacoides de los cloroplastos comienzan a desintegrarse y las proteínas fotosintéticas y sus mRNAs desaparecen formándose otro tipo de plastidios denominado: cromoplastos, los cuales contienen grandes cantidades de carotenoides y otros pigmentos responsables de la coloración (Smith, 1997).

Uno de los procesos morfogenéticos más dramáticos que sufren los plastidios es su transformación a cloroplastos fotosintéticamente activos. Los cambios más visibles son la rápida acumulación de clorofila y el desarrollo de un complejo sistema de membranas tilacoidales. Este proceso involucra el importe de aproximadamente 2000 diferentes proteínas citoplásmicas, a través de la membrana externa e interna de del cloroplasto (Schnell *et al.*, 2000). Dentro de este grupo se encuentran, por ejemplo,

algunas de las proteínas de la cadena transportadora de electrones y del sistema de transcripción y traducción del organelo, que deben ser ensambladas con las proteínas codificadas en el cloroplasto para formar complejos funcionales. Para que esto se lleve a cabo se requiere que haya una expresión coordinada y diferencial de los genes nucleares y plastídicos (Taylor, 1989).

El cloroplasto está formado por dos membranas, una externa y otra interna, que juntas se conocen como envoltura. Cada membrana tiene de 6-8 nm de grosor y están separadas por un espacio de 10 a 20 nm. La envoltura encierra un compartimento acuoso llamado estroma. La característica más particular de un cloroplasto es la membrana interna o membrana tilacoidal que se extiende a través del organelo, ésta encierra un compartimento acuoso interno denominado lumen. La membrana tilacoidal se distribuye como una serie de lamelas aplanadas que forman apilamientos conocidos como grana (Figura 1) (Audersik y Audersik, 1997).

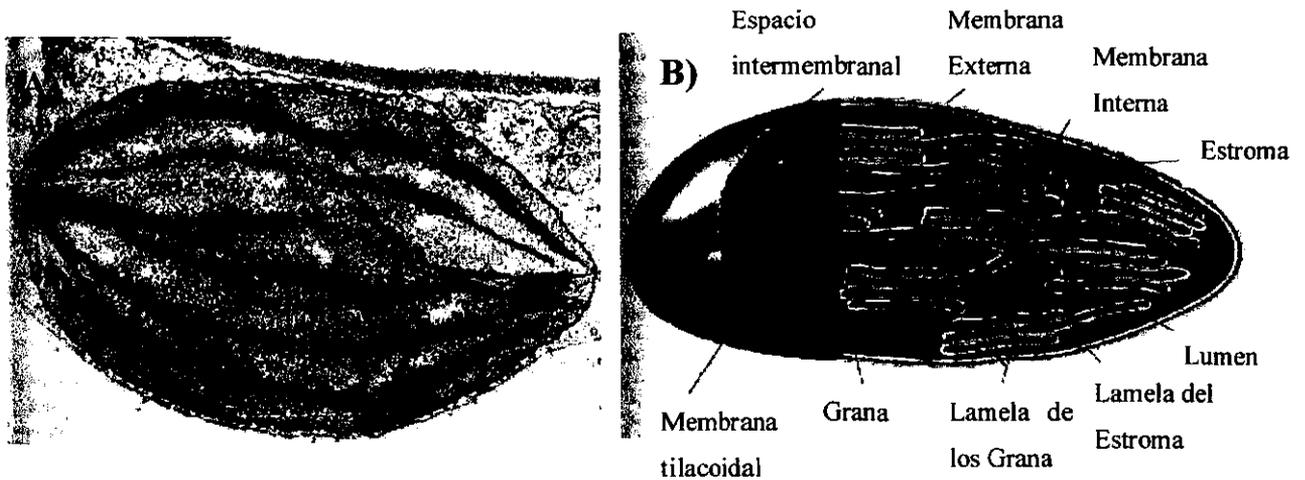


Figura 1. A) Micrografía electrónica de un cloroplasto de hoja de espinaca. B) Esquema de la estructura de un cloroplasto. Una membrana doble rodea una región acuosa, que se denomina el estroma. Localizada dentro del estroma está la membrana tilacoidal, la cual está plegada, aplanada y forma vesículas en forma de sacos. Estas vesículas se pueden presentar en apilamientos que reciben el nombre de grana o como vesículas aisladas que atraviesan el estroma y conectan los grana. Las regiones de la membrana tilacoidal que se localizan dentro de los grana y que no están en contacto con el estroma se llaman lamelas del estroma. El espacio interno que encierra la membrana tilacoidal se llama lumen.

II. Características de los mRNAs cloroplásticos

Muchos de los genes plastídicos están organizados en operones complejos (Figura 2) (Sugiura, 1992). La organización en operones es por lo general de genes que codifican proteínas de cierto proceso bioquímico, lo cual facilita la coordinación y acumulación estequiométrica de subunidades. Esta organización también ofrece la oportunidad de una regulación diferencial de algunos genes involucrados en la transcripción/traducción, independientemente de genes involucrados en la fotosíntesis. Otros operones contienen mezclas de genes con diferente función, por ejemplo el gen *rsp* (proteína ribosomal) es transcrito con *psaA-psaB* (subunidades de PSI); *rpoA* (subunidad de la RNA polimerasa) y *psbB-psbH* (subunidades de PSII) son transcritos con *petB-petD* (complejo del citocromo) (Mullet, 1993).

Una particularidad general de los mRNAs plastídicos, ya sea pre-mRNAs o RNAs maduros, es la presencia de una secuencia invertida repetida (IR), la cual se localiza en la región 3' no traducida (UTR) y se pliega en una estructura tallo-asa (Figura 2). Esta secuencia, en asociación con proteínas que se unen a ella, es capaz de estabilizar las regiones anteriores de los mRNAs que los poseen tanto *in vitro* e *in vivo* (Schuster y Lisitski, 1999).

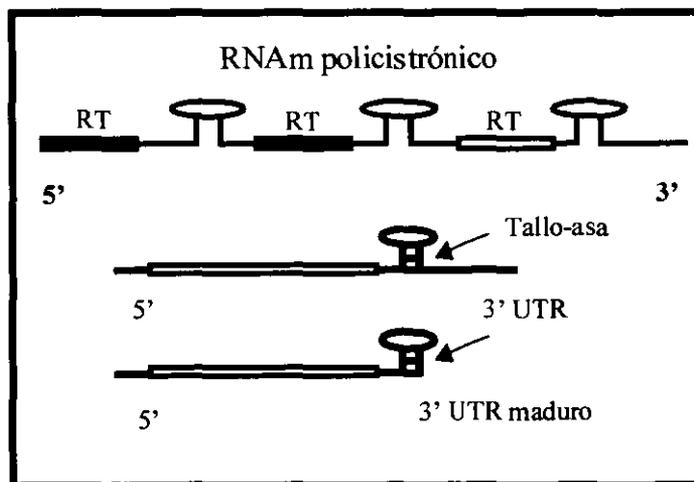


Figura 2. Mensajes cloroplásticos. Un mRNA típico de cloroplastos se encuentra en forma de policistrón, es decir presenta varias regiones traducibles (RT) y no traducibles. Una característica de dichos mRNA es que presentan una secuencia invertida repetida (IR) en la región 3' no traducible (3'UTR) que forma una estructura tallo-asa.

III. Regulación de la expresión genética en cloroplastos

La expresión de los genes cloroplásticos es regulada por una variedad de mecanismos. El primer nivel al cual se regula la expresión de los genes plastídicos es al 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, el cual establece las actividades de transcripción basal de los transcritos (Zurawski y Clegg, 1987). La actividad de la transcripción y los niveles de RNA en los proplastidios se mantienen bajos, pero se incrementan dramáticamente cuando entran en la zona de alargamiento celular y esta etapa en el desarrollo del cloroplasto es seguida por la activación de genes nucleares que codifican el aparato fotosintético. La expresión coordinada de genes nucleares y plastidiales en esta etapa requiere de una señal por parte del plástido que es necesaria para incrementar la expresión de genes nucleares que codifican el aparato fotosintético (Taylor, 1989). Finalmente, en los cloroplastos maduros, la transcripción decrece y la transcripción diferencial de *psbA* y *psbD* inducida por luz ayuda a mantener la síntesis de estas proteínas en los cloroplastos maduros (Sexton et al., 1990).

Aunque el control transcripcional es un elemento clave en la expresión de los productos génicos del plastidio, los eventos post-transcripcionales juegan un papel importante en la regulación de la expresión de los genes cloroplásticos (Gutiérrez *et al.*, 1999), por lo cual hablaremos en un inciso aparte de ellos.

Otro nivel de control en la regulación de la expresión del genoma cloroplástico es el nivel traduccional y post-traduccional. En plantas se ha demostrado que se requieren factores protéicos (factores en trans) que deben ser fosforilados, para que el mRNA de *psbA* se traduzca eficientemente en un sistema de traducción *in vitro* de cloroplastos de tabaco. Estos factores interaccionan con elementos específicos de la región 5' no traducida (5' UTR) del mRNA de *psbA* (Danon y Mayfield, 1991).

III: 1. Regulación post-transcripcional

La importancia del control post-transcripcional en la regulación de la expresión genética en el cloroplasto ha sido demostrada en el trabajo de Deng y Grussem (1988) en el que se analizaron la velocidad de transcripción y los niveles estables de mRNAs de los genes *psbA*, *rbcL*, *petD* y *atpE* en varios estadios de diferenciación de los plastidios de espinaca. Los resultados mostraron que la velocidad de transcripción de estos genes es prácticamente la misma durante todas las etapas estudiadas del desarrollo del cloroplasto, mientras que la acumulación de los mRNAs 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 mRNAs. Resultados similares se obtuvieron para *psaA-psaB*, que codifican componentes del fotosistema I (Mullet y Klein, 1987). Estos estudios sostienen que el control post-transcripcional es un mecanismo que permite la acumulación diferencial de mRNAs durante el desarrollo del cloroplasto (Grussem *et al.*, 1988).

Otro ejemplo que muestra la importancia que los eventos post-transcripcionales juegan en la regulación de la acumulación diferencial de algunos mRNAs plastídicos durante el desarrollo del cloroplasto es el corte de los intrones de los pre-mRNAs.

Por otro lado, la edición la cual es un proceso que altera la secuencia primaria de los nucleótidos de los transcritos: específicamente modifica a las citosinas para convertirlas en uridinas, es otro evento post-transcripcional que ocurre en varios transcritos cloroplásticos y mitocondriales. En algunos casos, la edición del RNA se requiere para que se forme el codón de inicio ó para que se sintetice una proteína funcional (Maier *et al.*; 1996). Se ha encontrado que las secuencias alrededor de los sitios de edición no están conservadas, lo que sugiere que debe existir un reconocimiento individual de cada una de las 25 a 30 citosinas que son editadas en los transcritos de los plastidios (Chaudhuri y Maliga, 1996). Otro evento post-transcripcional que regula la expresión genética en cloroplasto es el procesamiento del extremo 3' no traducible (3'UTR).

III. 2. Procesamiento del extremo 3'UTR

Las estructuras tallo-asa presentes en los transcritos cloroplásticos actúan como señales de estabilización de los mRNAs plastídicos tanto *in vivo* como *in vitro* (Stern y Gruissem, 1989; Stern *et al.*, 1991), por lo que estas secuencias se encuentran funcionando como elementos regulatorios en *cis* para la estabilización de los mRNAs (Gruissem *et al.*, 1988; Bandziulis *et al.*, 1989).

La formación del extremo 3' del mRNA de *atpB* de *Chlamydomonas reinhardtii* implica un corte endonucleolítico más abajo del sitio de termino del transcrito maduro, seguido por un procesamiento exonucleolítico hasta la estructura tallo-asa (Figura 2) (Stern y Kindle, 1993). Esto sugiere que la estructura tallo-asa actúa como una barrera que evita la degradación del transcrito. Sin embargo, la estabilidad de los mRNAs no es únicamente mediada por esta estructura secundaria, ya que las energías libres de estas estructuras no correlacionan con la estabilidad *in vitro* de algunos 3'-IR RNAs o la acumulación de sus correspondientes mRNAs *in vivo*. Esta observación sugiere que, además de la estructura tallo-asa, existen otros componentes que se encuentran involucrados en determinar la estabilidad de los extremos 3' de los mRNAs cloroplásticos, éstos parecen ser proteínas que unen RNA (RNA binding proteins) (Stern y Gruissem, 1989; Stern *et al.*, 1989; Chen y Stern, 1991).

III. 2. 1. Proteínas que interactúan con los extremos 3'UTR

Experimentos con geles de retardo y de entrecruzamiento con luz U.V. han aportado pruebas convincentes de que los 3'UTR de diferentes mRNAs cloroplásticos de espinaca interactúan con varias proteínas de unión a RNA (RNPs). Algunas de ellas parecen unirse indiscriminadamente a diferentes extremos 3'UTR (Stern y Gruissem, 1989; Schuster y Gruissem, 1991), aunque no se han realizado trabajos en donde se explore la posibilidad de uniones específicas determinadas por interacciones entre proteínas o por modificaciones post-traduccionales. El análisis detallado de la interacción del 3'UTR del mRNA del gen *petD*, que codifica la subunidad IV del citocromo *b₆f*, con RNPs de cloroplasto ha mostrado que algunas RNPs parecen unirse específicamente al precursor pero no al extremo 3' maduro, lo que sugiere que deben

estar relacionadas con el procesamiento de éste (Stern y Gruissem, 1989; Albá y Pagés, 1998).

Dentro del grupo de RNPs, algunas forman parte de un complejo de alto peso molecular de aproximadamente 500 kDa (Hayes *et al.*, 1996), de ellas se han identificado las siguientes: 100RNP, p67, 55RNP y un grupo de pequeñas proteínas de unión a RNA, denominadas 33RNP, 28RNP y 24RNP, y algunas otras que no han sido identificadas aún (Tabla 1) (Schuster y Gruissem, 1991; Hayes *et al.*, 1996).

El cDNA de la 100RNP fue aislado, y al analizar su secuencia se encontró que esta proteína es homóloga a la polinucleótido fosforilasa (PNPasa) de *Escherichia coli* (Mc Dowalld *et al.*, 1995; Hayes *et al.*, 1996). La PNPasa de *E. coli* es una exoribonucleasa 3'-5' que degrada RNA a nucleósidos difosfato de una manera procesiva (Littauer y Soreq, 1982). La 100RNP purificada es capaz de degradar totalmente el extremo 3' de *petD*, sólo haciendo una breve pausa en la estructura tallo-asa.

La PNPasa de *E. coli* se encuentra asociada a una endorribonucleasa: la RNAsa E (Huang *et al.*, 1998; Causton *et al.*, 1994). Utilizando la fracción proteica de cloroplastos de espinaca capaz de unirse a una columna de RNA, en ensayos de "western blot" con anticuerpos contra la RNAsa de *E. coli*, se obtuvo como banda única la p67. Ensayos de inmunoprecipitación del complejo de alto peso molecular con estos mismos anticuerpos identificaron a la p67 y a la 55RNP unida a ella. Cuando la 55RNP purificada se agregó a un ensayo con p67 y el extremo 3' del gen *petD*, se inhibió el corte endonucleolítico. Así se dedujo que la p67 es una endorribonucleasa sitio específica que corta los extremos 3' hacia arriba de la estructura tallo-asa. Este corte es inhibido por la 55RNP que se une a motivos ricos en AU arriba de la estructura tallo-asa, lo que permite que la vida media del mensaje se incremente (Hayes *et al.*, 1996).

Se propone que en ausencia de la 55RNP, p67 inicie el proceso de degradación del mRNA por un corte endonucleolítico arriba de la estructura tallo-asa y permita que la 100RNP, que forma parte del complejo, degrade rápidamente al RNA. Se ha observado que la unión de la 55RNP al complejo de alto peso molecular no es muy estable (Hayes *et al.*, 1996).

En el cloroplasto, la terminación de la transcripción es un proceso relativamente ineficiente y produce nucleótidos extra en el extremo 3'. Dichos nucleótidos son removidos durante el procesamiento del extremo 3', en una reacción de dos pasos (Figura 3) que involucra un corte endonucleolítico hacia abajo del extremo 3' maduro (paso 1) seguido por una degradación exonucleolítica 3'-5' hacia arriba de la estructura tallo asa (paso 2). La estructura tallo-asa parece actuar como una barrera que evita una mayor degradación, ya que la remoción de esta estructura da como resultado una rápida degradación del RNA, tanto *in vitro* como *in vivo*. Sin embargo, la estabilidad de los 3' UTR no puede solamente depender de que tan resistente sea la estructura tallo-asa, porque las energías libres de dicha estructura no correlacionan con la estabilidad observada en los mRNAs. Estas observaciones han llevado a sugerir que una o más RNPs interactúan con el tallo-asa y ayudan a formar y estabilizar los extremos 3' (Hayes *et al.* 199).

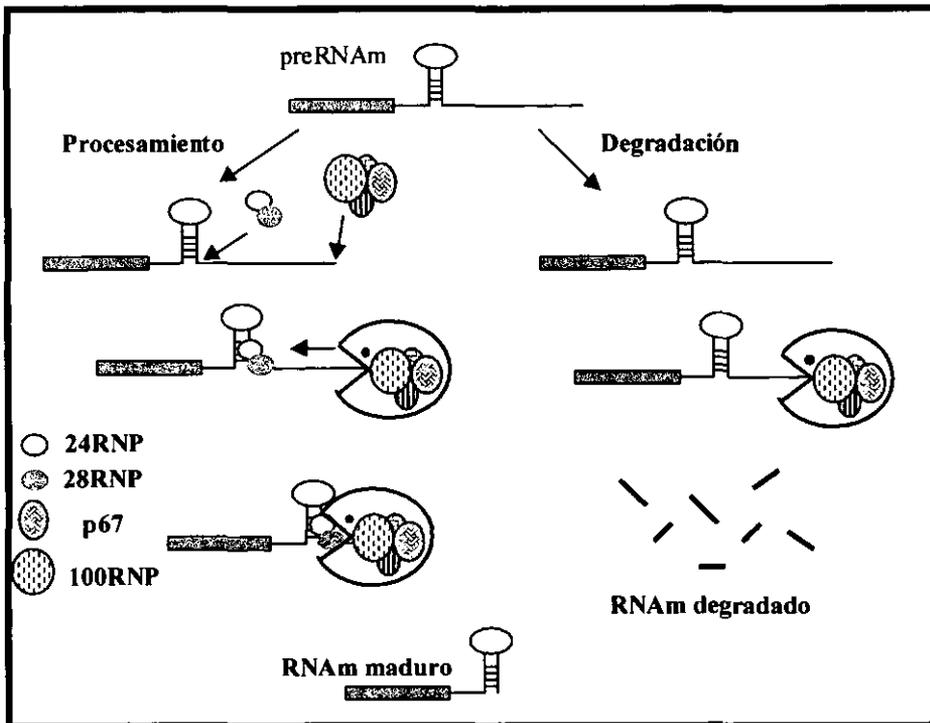


Figura 3. Procesamiento de 3' UTRs de mRNAs de cloroplastos. En este modelo el mRNA es procesado por un complejo de alto peso molecular que incluye la 100RNP, p67; para generar en presencia de la 24 y la 28RNP, un mRNA estable (Hayes, 1999).

Otras actividades de endonucleasas que podrían estar participando en la generación de los extremos maduros o en el proceso de degradación de los mensajes se han identificado utilizando el extremo 3'UTR del gen *petD*: la endo C1 (endonucleasa de cloroplasto 1) la cual corta dentro de la estructura de asa que se forma en el extremo 3' y esto ocasiona que el transcrito pierda su estabilidad; la endo C2 corta al RNA de *petD* en el codón de terminación y en el extremo 3' maduro del mRNA. El corte de C2 puede estar relacionado con un paso inicial hacia la degradación. Lo que resulta interesante es que este corte se encuentra dentro de la zona de unión de otra RNP: la 57RNP. El corte de *petD* en el codón de terminación lleva invariablemente a la degradación del mensaje (Chen y Stern, 1991; Yang *et al.*, 1996)

Tabla 1. Componentes identificados en el complejo de maduración/degradación de los extremos 3'UTR de mRNAs de cloroplastos de espinaca.

Masa molecular	Proteínas	Homología	Función
100 kDa	100RN P	PNPasa (polinucleótido fosforilasa)	Exonucleasa 3' - 5'
67 kDa	p67	RNAsa E de <i>E. coli</i>	Endorribonucleasa sitio específica
55 kDa	55RNP		Se ha propuesto que previene el corte de p67 hacia arriba de la estructura tallo-asa
33 kDa	33RNP		Se ha propuesto que podría estar modulando la actividad de la 100 RNP
28 kDa	28RNP		Dirige el correcto procesamiento del extremo 3'
24 kDa	24RNP		Desconocida, participa en probablemente da estabilidad al extremo 3' durante su procesamiento

III. 2. 2. Proteínas pequeñas de unión a RNA

Las pequeñas proteínas de unión a RNA de cloroplasto (RNPs) comprenden una familia de proteínas muy parecidas que pueden agruparse en tres sub-grupos (Otha *et al.*, 1995). Se han identificado miembros de estos subgrupos en tabaco, maíz, *Arabidopsis* y espinaca (Otha *et al.*, 1995). Las RNPs de cloroplasto se caracterizan por tener dos dominios de unión a RNA los cuales son muy conservados en proteínas de plantas, animales y levadura (Schuster y Gruissem, 1991). Cada uno de los dominios de unión a RNA está formado por aproximadamente 80 residuos y presenta dos secuencias consenso RNP1: GFGFVTM y RNP2: LFVGNL (Varani y Nagai, 1998). La estructura de este dominio altamente conservado ha sido estudiada por resonancia magnética nuclear (NMR) en varias de estas proteínas (Howe *et al.*, 1994; Avis *et al.*, 1996; Garret *et al.*, 1994; Hoffman *et al.*, 1991; Lu *et al.*, 1995), encontrándose que se pliega en una estructura compacta $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ (Cusack, 1999). Una característica particular de las RNPs de cloroplasto es que la proteína madura presenta un dominio ácido amino terminal (Figura 4). El análisis de los cDNAs de las diferentes RNPs hasta ahora descritas muestra que las proteínas presentan una secuencia de tránsito que las dirige al cloroplasto y en el caso de las proteínas de *Arabidopsis* se ha demostrado que estas proteínas sintetizadas *in vitro* pueden ser introducidas a cloroplastos intactos (Otha *et al.*, 1995). Estos resultados indican que los genes se localizan en el núcleo y que las proteínas son sintetizadas en el citoplasma y llevadas al cloroplasto en donde la secuencia de tránsito es eliminada produciendo una proteína funcional.

III. 2. 2. 1. La 28 y la 24RNP de espinaca

La 28RNP fue la primer proteína purificada de cloroplastos de espinaca con base en su co-fraccionamiento con la actividad de procesamiento del extremo 3' de mRNAs de cloroplastos. En experimentos donde se inmunosubstraía a la 28RNP, empleando anticuerpos anti-28RNP, del extracto de procesamiento de RNA de cloroplasto se observaron alteraciones en el correcto procesamiento *in vitro* de al menos cuatro diferentes mRNAs (*rbcL*, *psbA*, *petD* y *rps14*), lo que sugirió fuertemente que la 28RNP es 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 RNAs que contengan la estructura tallo-asa y no posee actividad de nucleasa (Schuster y Gruissem, 1991; Lisitski *et al.*, 1995). La 28RNP recombinante de espinaca en *E. coli* se une con una afinidad semejante a varias secuencias de RNA: secuencias ricas en U, estructuras tallo-asa, RNA de transcritos sentido y antisentido en regiones 5' ó 3'UTR, y en regiones codificadoras de genes cloroplásticos, sólo mostrando baja afinidad por poli A o poli C. Sin embargo, la proteína nativa cloroplástica no presenta el mismo comportamiento, ya que no se une por igual a todos los mensajes de cloroplastos ni a todas las regiones del mensaje, lo que llevó a sugerir que la secuencia de aminoácidos de la 28RNP contiene una afinidad básica por el RNA, pero debe ser la interacción con otras proteínas o alguna modificación post-traducciona, lo que le confiere la especificidad de unión a RNAs en el cloroplasto (Lisitsky y Schuster, 1995).

Los cDNAs de la 28RNP y de la 24RNP de espinaca han sido clonados (Schuster y Gruissem, 1991, Abrahamson, comunicación personal). La comparación de las secuencias de la 24RNP y la 28RNP muestra que estas proteínas presentan un 57% de identidad a nivel de aminoácidos totales. En el extremo amino terminal ambas proteínas contienen un gran número de aminoácidos de tipo ácido, 30% y 27% para la 24RNP y la 28RNP respectivamente. Presentan un alto grado de identidad en los dominios de unión a RNA y una divergencia considerable en el extremo ácido amino terminal (13% de identidad) (Figura 4).

En plantas de espinaca cultivadas en luz, el nivel del transcrito de la 24RNP es mayor en hojas jóvenes que en hojas maduras y poco abundante en raíz y tallo. El transcrito de la 24RNP se presenta a niveles semejantes en hojas de plantas cultivadas en la obscuridad y en raíz, pero la exposición a luz hace que los niveles del transcrito se incrementen después de 24 h. Esto indica que la acumulación del transcrito de la 24RNP es controlada por luz, así como por la etapa de desarrollo de la planta y es tejido específica (Abrahamson, comunicación personal). Trabajo experimental en nuestro laboratorio sugiere que esta proteína está involucrada en el procesamiento de los extremos 3'UTR de *petD*.

Dominio ácido	
28RNP	WEQ EGSTNAVLEG ESDPEGAVSW GSETQVSDEGG VEGGQGFSEP PEEAK
24RNP	SISSSFVRHV RISSE....F EQEEDVMGDDD .AGRQPNFS. .PDLK
Primer Dominio de unión a RNA	
LFVGNL	PYDVDSEKLAG IFDAAGVVEIAE VIYNRETDRSR GFGFVTM
IFVGNL	PFNVDSAELAG LFGAAGTVEMVE VIYDKLTGRSR GFGFVTM
Región interdominios	
	STVEEA EKAV ELLNGYDMDG RQLTVNKAAP RG...SPERA PRGDFEPCSR
	SSVEEVEAAA QQFNNYELDG RTLRVTEDSH KDMTLPRVES ECDSFGSSNR
Segundo dominio de unión a RNA	
VYVGNL	PWDVDTSRLEQ LFSEHGKVV SARV VSDRETGRSR GFGFVTM
VHVGNL	SWKVVDDALKT LFSETGDVVEAKV IYDRDTGRSR GFGFVTY
Región carboxilo terminal	
	SSESEVNDA IAALDGQTL DGRAVRVNVA EERPRRAF.
	NSANEVNTA IESLDGVDL NGRSIRVTAA EARQRRGPK

Figura 4. Comparación de las secuencias de aminoácidos de la 24 y 28RNPs maduras. Las secuencias en negritas representan las secuencias consenso de unión a RNA.

III. 3. Fosforilación de proteínas que unen RNA

Se han encontrado RNPs de cloroplastos en tabaco (Li y Sugiura, 1990; Ye *et al.*, 1991), en espinaca (Schuster y Gruissem, 1991), en chícharo (Subbaiah y Tewari, 1993), en maíz (Cook y Walker, 1992) y en *Arabidopsis* (Bar-Zvi *et al.*, 1992). En tabaco se ha descrito una proteína de unión a RNA (RNP) de 60kDa que forma parte de un complejo proteico e interacciona con el extremo 5'UTR de *psbA* en cloroplastos de *Chlamydomonas reinhardtii* (Danon y Mayfield, 1991). Esta proteína es fosforilada de manera dependiente de ADP (Danon y Mayfield, 1994) y esta modificación inhibe la unión del complejo al mRNA de *psbA*. La protein-fosfotransferasa que lleva a cabo esta modificación, se encuentra asociada al complejo y utiliza el β -fosfato de ADP para fosforilar a su sustrato (Danon y Mayfield, 1994).

Una RNP de 54kDa (p54) aislada de cloroplastos de *Sinapis alba* es una endorribonucleasa que participa en el procesamiento *in vitro* de los extremos 3' de los precursores de *trnK* y de *rps16* (Nickelsen y Link, 1993). Esta proteína es fosforilada *in*

in vitro por una proteín-cinasa de corazón de bovino (PKA) y se encontró que tanto la unión a RNA como el procesamiento se incrementaban cuando p54 se encontraba fosforilada y decrecían cuando no lo estaba (Llere y Link, 1997).

Además de la fosforilación que sufre la RNP de tabaco de 60 kDa y la p54 de *Sinapis alba* se ha demostrado que dos RNPs de cloroplastos de espinaca se fosforilan, una de ellas es la p34 (Kanekatsu *et al.*, 1993) que es fosforilada por una casein-cinasa II de espinaca (CK-II) y la otra es la 28RNP que es capaz de ser fosforilada ya sea *in vivo*, cuando los cloroplastos intactos se ponen en presencia de [³²P]-ortofosfato, o *in vitro*, donde la 28RNP recombinante es un excelente sustrato para la subunidad α recombinante de la casein-cinasa II de maíz (CK-II) cabe mencionar que la 28RNP se fosforila en la serina número 22 del dominio amino terminal (figura 5) (Lisitsky y Schuster, 1995). Interesantemente la 24RNP a pesar de presentar una alta identidad (57%) con la 28RNP, no es fosforilada por dicha cinasa en los ensayos de fosforilación *in vitro* (Lisitsky y Schuster, 1995).

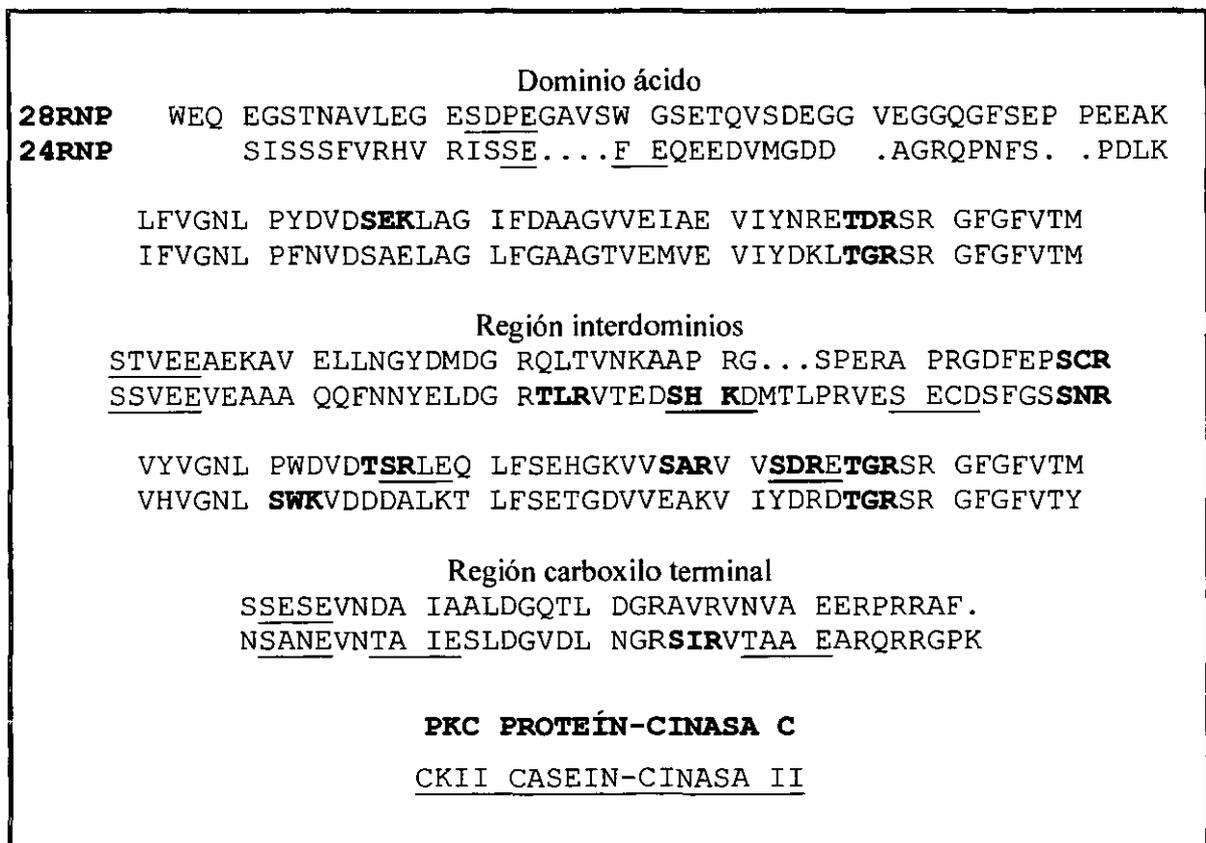


Figura 5. Secuencias consenso de fosforilación para la 28RNP y la 24RNP de espinaca.

III. 4. Algunas cinasas de plantas.

La fosforilación y defosforilación de las proteínas son mecanismos fundamentales para la regulación celular. Estas modificaciones post-traduccionales, las cuales son catalizadas por proteín-cinasas y fosfatasas, constituyen un interruptor molecular reversible. En las plantas, la fosforilación de proteínas ha sido implicada en el control de la mayoría de los eventos de desarrollo y de las respuestas ambientales, incluyendo la regulación del ciclo celular, de la transcripción y la traducción, el control del metabolismo del carbono y del nitrógeno, la regulación del crecimiento y la diferenciación y la respuesta a los estreses bióticos y abióticos (Gribskov, 2001).

La importancia de la actividad de las proteín-cinasas en la regulación de procesos metabólicos se refleja en la presencia de un gran número de genes de estas proteínas en el genoma de plantas. Actualmente se estima que cerca de 1000 genes codifican proteínas que pertenecen a la superfamilia de cinasas en *Arabidopsis thaliana* (Gribskov, 2001). La fosforilación de proteínas es un mecanismo generalizado mediante el cual las células integran las señales extracelulares y mantienen la homeostasis y las funciones celulares. La fosforilación de proteínas mediante proteín-cinasas juega un papel clave en la transducción de señales en plantas (Harmon *et al.*, 2000). Por ejemplo, se sabe que las cascadas de transducción de señales que involucran a las proteín-cinasas activadas por mitógenos (MAPK) están conservadas en eucariotes desde levaduras hasta los humanos (Gustin *et al.*, 1998). Cada cascada consiste de tres cinasas de proteínas MAPKKK, MAPKK y MAPK. Estas cinasas están codificadas por un gran número de genes en varias especies de plantas (Mizoguchi *et al.*, 1997). Muchos de estos genes participan en diferentes vías de señalización y codifican las MAPKs, las cuales tienen alta similitud entre sí en la secuencia; lo que sugiere que tienen un papel importante y redundante en la transducción de señales en plantas. Numerosos estímulos ambientales, de desarrollo y las hormonas activan a las MAPKs de plantas. También se ha descrito que proteínas cinasas del tipo receptor (RLK), es decir proteínas que tienen un dominio cinasa, un dominio citoplásmico, un dominio

transmembranal y otro extracelular, tienen un papel fundamental en la control de la autofecundación, de la organogénesis y del desarrollo (Clark, et al. 1997).

Otro tipo de cinasas que se han descrito recientemente son las CDPKs. Cuatro tipos de cinasas constituyen la superfamilia de las proteín-cinasas dependientes de calcio. Estas cinasas difieren en su forma de regulación; existen las reguladas por su unión a Ca^{2+} (CDPKs); por su unión a calmodulina: proteín-cinasa dependientes de calmodulina (CaMKs); una combinación de las dos anteriores: proteín-cinasas dependientes de calmodulina y calcio (CCaMKs) o bien que no se regulan ni por calmodulina ni por calcio: proteín-cinasas relacionadas con CDPKs (CRKs) (Harmon *et al.*, 2000).

Estas enzimas tienen tres dominios funcionales: el catalítico, el de autoinhibición y el de unión a Ca^{2+} (Harmon *et al.*, 2000) El dominio de unión a Ca^{2+} es muy parecido en su secuencia al de unión a calmodulina (~ 40% de identidad), por lo que es llamado calmodulin-like, aunque no se une a dicha molécula (Huang *et al.* 1996; Yoo y Harmon, 1996; Harper *et al.*, 1994) Las CDPKs se encuentran exclusivamente en protozoarios y en plantas y están notablemente ausentes en el genoma de levaduras y animales (Harmon *et al.*, 2000).

Las CDPKs están en un estado basal de actividad, debido a que su dominio de autoinhibición no les permite que el dominio cinasa sea activo (Harper *et al.*, 1994). El modelo más simple de activación para las CDPKs que se propone es que el Ca^{2+} promueve un cambio conformacional del dominio calmodulin-like, lo que termina con la autoinhibición de la cinasa y ésta se vuelve activa (Harmon *et al.*, 2000).

HIPÓTESIS

Se propone que la 24RNP se fosforila y que esta modificación produce un cambio en su afinidad por el extremo 3'UTR de *petD* de mRNA de cloroplasto.

OBJETIVOS

1. Determinar si la 24RNP recombinante se fosforila *in vitro*.
2. Examinar si esta modificación post-traducciona l modula la afinidad de la 24RNP por el extremo 3' no traducible de *petD*.
3. Establecer si existe una actividad cinasa en cloroplastos capaz de fosforilar a la 24RNP.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

A) Para demostrar si la 24RNP recombinante de espinaca se fosforila *in vitro*, se incubó esta proteína con una PKC de cerebro de rata y con una CDPK de membrana plasmática de betabel.

B) Para establecer la afinidad de la 24RNP por el extremo 3'UTR de *petD*, la 24RNP recombinante, fosforilada y no fosforilada, fue entrecruzada por luz UV con el RNA marcado radioactivamente.

C) Para determinar si en el cloroplasto existe una actividad cinasa capaz de fosforilar a la 24RNP, una preparación de cloroplastos intactos de espinaca se incubó con un anticuerpo contra la CDPK de betabel. La fracción inmunoprecipitada se utilizó para fosforilar la 24RNP en un ensayo *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. *Material Biológico.*

3'UTR de *petD* (plásmido P2*). Se utilizó el extremo 3' no traducible (3'UTR) del gen *petD* clonado entre los sitios KpnI y XbaI del plásmido pIB176 bajo el promotor de la RNA polimerasa T7. La longitud total del 3'UTR es de 218 nucleótidos, con un 40% U, un 27.9% de A, un 15.6% de G y un 16.5% de C (Stern y Grissein, 1989).

PKC. Una cinasa dependiente de calcio (PKC) se inmunoprecipitó de cerebro de rata empleando anticuerpos comerciales anti PKC contra las isoformas α y β , ambas dependientes de Ca^{2+} . Esta preparación fue proporcionada por la Dra. María Eugenia Torres, del Depto. Bioquímica, Facultad de Medicina UNAM.

CDPK. La proteína-cinasa dependiente de calcio (CDPK) se aisló de membrana plasmática de hojas de betabel, su masa molecular es de 63 kDa y para ser activa requiere de una concentración de 2 μM de Ca^{2+} libre. Tiene una actividad específica de 286.5 nmol/min/mg de proteína. Esta preparación fue proporcionada por el Dr. Luis González de la Vara, del Depto. Bioquímica, CINVESTAV Irapuato.

Anti CDPK. Se utilizó un anticuerpo policlonal, el cual se obtuvo a partir de la CDPK purificada de membrana plasmática de betabel. Este anticuerpo fue producido y proporcionado por el Dr. Luis González de la Vara.

Anti 24RNP. Se empleó la 24RNP recombinante para inyectar dos conejas por un tiempo aproximado de mes y medio (inyecciones semanales de 500 μg cada una). Se realizó una sangría de prueba para determinar la presencia de anticuerpos contra la proteína 24RNP recombinante de espinaca. Confirmado esto, se llevó a cabo la sangría de cosecha y la determinación del título de los anticuerpos obtenidos. Los anticuerpos (IgGs) se purificaron con una precipitación de sulfato de amonio realizando nuevamente la determinación del título. Fue posible obtener un ensayo específico para una banda aumentando la dilución del anticuerpo empleado en la inmunodetección. Empleando este anticuerpo se demostró la capacidad de reconocer a la 24RNP en extractos crudos

de hojas de espinaca. Este anticuerpo fue producido por la QFB Sandra Robles Hernández en el laboratorio de la Dra. Herminia Loza Tavera.

Filtración en gel.

Se utilizó una resina Superdex 75 (Amersham Pharmacia), la cual separa proteínas globulares de hasta 100 kDa, y es excelente para separar monómeros y dímeros de proteínas recombinantes de bajo peso molecular. La filtración en gel fue realizada por el M. en C. Elpidio García Ramírez del Depto. de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM.

2. Producción y purificación de la 24RNP recombinante.

El sistema QIAexpressionist (QIAGEN, Chastsworth, CA) es una forma rápida y fácil para expresar y purificar proteínas recombinantes ya que las proteínas son clonadas en un vector en fase con una etiqueta de histidinas ya sea en el extremo amino o carboxilo terminal. Los vectores pQE generalmente producen un alto nivel de expresión de proteínas y la purificación de la proteína recombinante se basa en la utilización de la resina Ni-NTA que posee una alta afinidad por la etiqueta de histidinas presentes en la proteína a purificar.

La subclonación de la 24RNP de espinaca con la etiqueta de histidinas en el extremo amino de la proteína madura se realizó en pQE30 entre los sitios BamHI y PstI (pQE-24RNP). Después de que se verificó la presencia del plásmido conteniendo el gen de interés clonado en las células JM109, el plásmido se secuenció para confirmar la correcta fase del mensaje y se procedió a transformar células M15 (cepa que posee el plásmido represor pREP4 que mantiene la expresión inhibida hasta que se añade IPTG) que es donde se induce la expresión. Esta subclonación fue realizada por Gabriela Toledo (Toledo, 1998).

En este trabajo primero se realizó una expresión en pequeña escala con el propósito de verificar que las bacterias producían la proteína 24RNP utilizando básicamente el protocolo descrito en el manual de QIAexpressionist, salvo que se ajustaron algunos volúmenes y temperaturas.

2.1. Inducción en pequeña escala.

El protocolo se realiza de la siguiente manera:

1. Inocular 3 mL de medio LB previa adición de ampicilina y kanamicina (100 µg/mL y 25 µg/mL respectivamente) con una colonia M15 con pQE-24RNP y cultivar toda la noche a 37 °C con agitación.
2. Inocular 3 mL de medio LB fresco con los mismos antibióticos y con 200 µL del cultivo anterior. Utilizar como controles bacterias no transformadas y transformadas con el plásmido pQE sin inserto.
3. Cultivar las bacterias con agitación hasta que su absorbancia sea 0.7 a una longitud de onda de 600 nm (aproximadamente 3 horas).
4. Inducir la expresión de la proteína mediante la adición de IPTG a una concentración final de 0.6 mM y dejar crecer las bacterias durante 4 horas a 34 °C.
5. Centrifugar 1.5 mL del cultivo anterior a 4000xg por 15 min y recuperar el sobrenadante.
6. Resuspender en 200 µL de solución amortiguadora C (8 M urea, 0.1 M fosfato de sodio, 0.01 M Tris-HCl, pH 6.3).
7. Incubar a 25 °C durante 1 hora.
8. Analizar las muestras obtenidas en un SDS-PAGE para verificar que se llevó a cabo la inducción de proteínas.

2.2. Inducción a gran escala y purificación de la proteína 24RNP recombinante bajo condiciones nativas.

Los pasos del protocolo son:

1. Inocular 50 mL de medio LB con ampicilina y kanamicina (100 µg/mL y 25 µg/mL respectivamente) con una colonia M15 con pQE-24RNP y cultivar de 5-6 horas ($A_{600} = 0.7-0.9$) con agitación. Con este medio inocular 2 L de medio LB fresco con ampicilina y kanamicina. Cultivar durante 3 horas a 33 °C hasta lograr una absorbancia de 0.7-0.9 a 600 nm.

2. Inducir la expresión de la proteína con una concentración final de 0.6 mM de IPTG. Dejar crecer las bacterias a 28 °C durante 19 horas.
3. Centrifugar a 4,000xg por 20 min y recuperar la pastilla.
4. Resuspender en la solución amortiguadora de sonicación (50 mM fosfato de sodio, 300 mM NaCl, pH 8.0). Utilizar 50 mL de solución amortiguadora de sonicación por 10 mg de la pastilla.
5. Sonicar las células a 200W, con pulsos de 1 min en hielo y 1 min de sonicación. Se sonica hasta que la absorbancia A_{260} alcance un máximo y no varíe (repetir aproximadamente 7 veces).
6. Agregar RNAsa A hasta alcanzar una concentración final de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ incubar en hielo por 15 min.
7. Centrifugar a 10,000xg por 20 min y colectar el sobrenadante.
8. Incubar el sobrenadante con 300 mg de resina Ni-NTA (Qiagen) previamente equilibrada en solución amortiguadora de sonicación, y agregar 50 U de fosfatasa alcalina dejar en agitación por 1 hora a 4 °C.
9. Después de la incubación, retirar el sobrenadante y lavar la resina con 8 mL de la solución amortiguadora de lavado (50 mM de fosfato de sodio, 300 mM de NaCl 10% glicerol, pH 6.0).
10. Eluir la proteína con imidazol 20, 50 y 150 mM (aforar a esa concentración con la solución amortiguadora de lavado). Para detectar donde eluye la proteína se analizan las alícuotas de las fracciones en SDS-PAGE.

3. Cuantificación de proteínas (Bradford).

El ensayo de proteína está basado en el cambio de color del colorante Coomassie brilliant blue 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 (Bradford, 1976).

Procedimiento

El procedimiento es el siguiente:

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

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

2. Preparar las muestras, 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 s de proteína por μL de muestra, utilizando la fórmula: $A = C m + b$

Donde:

A = absorbancia

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

m = pendiente

b = ordenada al origen

4. Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturante (PAGE-SDS).

El análisis de proteínas en geles de poliacrilamida es una técnica muy útil ya que permite observar las proteínas presentes en un extracto celular como bandas discretas separadas en un soporte sólido. Este método se basa en las propiedades de las proteínas

de poseer una carga y una masa y por lo tanto desplazarse por efecto de una corriente eléctrica. Esta técnica permite, con base en la comparación de las bandas de proteína con marcadores de masa molecular conocida, determinar el tamaño aproximado de las proteínas en estudio y observar el grado de pureza en un protocolo de purificación de proteínas (Laemmli, 1970) .

Soluciones

Acrilamida 30% (100 mL)

Acrilamida	30 g
Bisacrilamida	0.8 g

Solución amortiguadora separador 25X (100 mL)

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

Solución amortiguadora concentrador 25X (100 mL)

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

Solución amortiguadora de carga 5X (10 mL)

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

Solución amortiguadora de corrida 10X (1 L)

Tris base	30 g
Glicina	144 g
SDS	10 g

Utilizar la solución amortiguadora a una concentración 1X

Persulfato de amonio al 20%

Colorante Coomassie para teñir geles (100 mL)

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

Solución fijadora y desteñidora (100 mL)

Metanol 20%	20 mL
Ácido acético 7.5%	7.5 mL

Procedimiento

1. Hacer geles con separadores de 1 mm con la siguiente composición:

Gel separador

	% de acrilamida	
	12%	15%
Agua	1.4 mL	1.0 mL
Buffer separador	1.0 mL	1.0 mL
Acrilamida	1.6 mL	2.0 mL
Persulfato de amonio 20%	25 μ L	25 μ L
TEMED	2.5 μ L	2.5 μ L

Gel concentrador

Agua	1 mL
Buffer concentrador	444 μ L
Acrilamida	300 μ L
Persulfato de amonio 20%	20 μ L
TEMED	μ L

2. Colocar las muestras previamente cuantificadas en tubos eppendorf y agregar la solución amortiguadora de carga 5X a una concentración final 1X.
3. Hervir las muestras durante 5 min.
4. Cargar las muestras en los pozos de los geles previamente montados en el soporte del equipo Mini-protean II (BioRad), el cual se coloca en el tanque que contiene la

solución amortiguadora de corrida. La solución amortiguadora se debe agregar a una concentración 1X.

5. Correr las muestras a 20 mA hasta que se apilen y una vez que entran al gel separador se corren a 100 V. El tiempo de corrida depende de la concentración del gel y de las muestras.
6. Al finalizar la electroforesis los geles pueden ser teñidos con Azul de Coomassie o con plata o transferidos a membranas de PVDF o nitrocelulosa para hacer Western blots.

5. Transferencia y Western Blot.

La identificación de proteínas por anticuerpos es una herramienta en estudios bioquímicos que permite detectar la presencia de una determinada proteína en extractos celulares. La técnica de Western blot se basa en la transferencia de una proteína a un soporte de nitrocelulosa (Towbin *et al.*, 1979) u otro soporte semejante y su detección por un anticuerpo específico, el cual posteriormente es detectado por un segundo anticuerpo conjugado a una reacción enzimática que produce color o luz (Burnette, 1981).

Soluciones

Solución amortiguadora de transferencia

Tris pH 8.3	25 mM
Glicina	192 mM
Metanol	20% v/v

TBS

NaCl	50 mM
Tris pH 7.4	50 mM

TBS-T (0.1%)

TBS + 0.1% (volumen / volumen) de tween 20

Procedimiento

1. Preparar con anticipación la solución amortiguadora de transferencia sin metanol y mantenerlo en refrigeración hasta su uso. Añadir el metanol al momento de utilizar la solución amortiguadora.
2. Después de la electroforesis remojar el gel en la solución amortiguadora de transferencia para preequilibrarlo durante 3 min.
3. Cortar seis trozos de papel filtro Whatmann 3MM de 7 x 9 cm y uno de PVDF (Bio-Rad) de 8.5 x 6 cm. Hidratar la membrana añadiendo metanol durante 5 segundos y después añadir agua hasta observar que la membrana se humedece completamente.
4. Colocar la solución amortiguadora de transferencia enfriado y ya con el metanol en una charola, dentro de la que se ensambla la transferencia. Colocar el cassette en el recipiente y sobre éste: una fibra, tres rectángulos de papel filtro, la membrana, el gel, tres cuadros de papel filtro, una fibra. Cerrar el cassette y colocarlo en el electrodo mini Trans-Blot en la orientación correcta para que se lleve a cabo la transferencia (membrana hacia el polo positivo).
5. Llenar éste hasta la mitad con la solución amortiguadora de transferencia e introducir una barra magnética. Colocar la unidad de enfriamiento Bio-Ice previamente congelada en el tanque .
6. Hacer la electrotransferencia a voltaje constante de 100V (el amperaje comienza con 250 mA) durante 1 h con agitación.
7. Después de la transferencia, enjuagar la membrana con TBS-T (0.1%) para quitar la acrilamida pegada a la membrana.
8. Bloquear la membrana en TBS con 5% de leche descremada en polvo durante 1 h a temperatura ambiente y con agitación.
9. Agregar el primer anticuerpo diluido en TBS con 5% de leche. Incubar a 37° con agitación durante 2 h. La dilución a la que se emplea el anticuerpo anti-24RNP es 1:15,000.
10. Quitar el primer anticuerpo y lavar la membrana con 20 mL de TBS-T. Hacer un lavado rápido y dos de 15 min con agitación.

11. Añadir el segundo anticuerpo (anti-IgGs de conejo acoplado a peroxidasa de rábano Bio-Rad) diluído a una concentración 1:2000 en TBS y 5% de leche. Incubar durante 2 h a temperatura ambiente.
12. Eliminar el segundo anticuerpo y hacer tres lavados a la membrana con TBS-T. Un lavado rápido y los otros dos de 15 min cada uno y con agitación.
13. Revelar por medio de una reacción de quimiluminiscencia empleando los reactivos de ECL (Amersham Pharmacia Biotech RPN 2106).

6. Fosforilación de la 24RNP

Para analizar si la 24RNP se fosforila *in vitro* se utilizó el siguiente protocolo, el cual fue estandarizado en el laboratorio de la Dra. María Eugenia Torres, del Depto. Bioquímica, Facultad de Medicina UNAM. En los experimentos donde se determinó si la 24RNP se fosforilaba *in vitro* se empleó [γ - 32 P]ATP.

Soluciones

Mezcla de fosforilación

	Concentración final
MgCl ₂	10 mM
MnCl ₂	10 mM
ATP	200 μ M
Ácido okadaico	1 μ M
CaCl ₂	250 μ M
Albúmina	50 μ g/mL

Aforar con la solución amortiguadora de cinasas.

Solución amortiguadora de cinasas

	Concentración final
Tris pH 7.5	20 mM
EDTA	1 mM
EGTA	1 mM
Ortovanadato de sodio	1 mM
β -glicero fosfato	5 mM
NaF	50 mM
β -mercaptoetanol	0.1 %
Benzamidina	1 mM

PMSF	0.2 mM
Leupeptina	5 µg/ml
PpiNa	5 mM

1. Colocar 10 µL de la mezcla de fosforilación para fosforilar 21µg (3 µL) de 24RNP.
2. En el caso de que se requiera detectar la fosforilación de la 24RNP se agregan 10 µCi de [γ -³²P]ATP (Actividad específica 3000 Ci/mmol, 10 Ci/mL).
3. Añadir la proteína-quinasa con la que se llevará a cabo la fosforilación, para 21 µg de 24RNP se utilizaron 1.5 µL de CDPK (.Actividad específica =286.5 nmol/min/mg).
4. Incubar la mezcla durante 120 min a 30 °C con agitación.
5. Detener la reacción con una concentración final 1 mM de EGTA.

7. Inmunoprecipitación de una actividad cinasa de cloroplastos de espinaca empleando un suero anti-CDPK de betabel y fosforilación de la 24RNP con esta preparación.

Las columnas de proteína A-anticuerpo son de las más versátiles y fáciles de preparar pues el anticuerpo se une a la matriz vía el dominio constante y el sitio de unión del antígeno se encuentra orientado correctamente para una máxima interacción (Harlow y Lane, 1988)

Se utilizan las mismas soluciones del protocolo 6.

Procedimiento

1. Aislar cloroplastos intactos de espinaca (ver técnica: Aislamiento de cloroplastos de espinaca) y cuantificar la proteína presente en dichos cloroplastos.
2. Lisar los cloroplastos (1.5 mg de proteínas/150 µL) con tritón a una concentración final de 1%. Incubar 30 min a 4°C con agitación y centrifugar 3 min a 14,000 rpm
3. Pasar el sobrenadante a un tubo y agregarle el anticuerpo contra la CDPK (dilución 1:10) y la proteína A-sefarosa (ZYMED) (relación 1 µL de proteína A por 3 µL del extracto de cloroplastos).
4. Incubar durante 2 h en hielo con agitación.
5. Centrifugar 7 min a 14,000 rpm y desechar el sobrenadante.

6. Lavar la pastilla con la solución amortiguadora de cinasas (2-3 veces).
7. Añadir 50 μL de la mezcla de fosforilación y 30 μg de 24RNP e incubar por 1 h a 30°C con agitación.
8. Centrifugar 5 min a 14,000 rpm y desechar sobrenadante.
9. Adicionar 20 μL de la solución amortiguadora de corrida y hervir durante 10 min.
10. Correr un SDS-PAGE al 15%.

8. Transcripción de RNA para procesamiento in vitro.

Este protocolo es adaptado del publicado por Schuster y Gruissem (1990).

Soluciones

El agua utilizada en la preparación de todas las soluciones que son usadas en este protocolo deben tratarse con DEPC (dietilpirocarbonato) 800 $\mu\text{L/L}$ de agua durante 12 h y esterilizarse por autoclave.

RNA polimerasa T7 (Promega)

DTT	40 mM
rNTPs 10X	
rG, rC, rA,	5 mM
rU	0.25 mM
Acetato de amonio	5 M
Acetato de sodio	3 M [pH 5.5]
EDTA	0.25 M
SDS	20 %

Amortiguador de carga

Formamida desionizada

0.1% xileno de cianol y azul de bromofenol

Procedimiento

1. Digerir el DNA del plásmido con la enzima de restricción apropiada para linearizarlo (el plásmido P2* tiene clonado el 3'UTR del gen *petD* de espinaca bajo el promotor T7 y se debe digerir con Xba I).
2. Correr la digestión en un gel de agarosa para comprobar que haya sido efectiva y purificar el plásmido linearizado con el kit de extracción de ácidos nucleicos de geles de agarosa (Qiaex II Gel Extraction Kit (150)). La concentración final del plásmido linearizado debe ser de 200 µg/mL.
3. En un tubo eppendorf combinar:

2 µL	DNA plasmídico (0.4 µg)
4 µL	Solución amortiguadora de reacción 5X
0.5 µL	DTT 40 mM
2 µL	rNTPs 10X
9 µL	H ₂ O para H-RNA
0.5 µL	Rnasin (Promega)
4. Adicionar 2 µL de [α -³²P]-UTP para H-RNA y 8 µL.
5. Agregar 0.5 a 1 µL (10-20 U) de T7 RNA polimerasa.
6. Incubar a 37°C (T7) durante 45 a 60 min (revisar las condiciones especificadas para cada enzima en el protocolo correspondiente).
7. Adicionar 15 µL de NH₄OAc 5M (u 8 µL de 7.5 M) y 100 µL de etanol
8. 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.
9. Hervir las muestras por 3 minutos. Ponerlas en hielo. Cargar las muestras en un gel de acrilamida-urea (5%) (ver técnica: Electroforesis de RNA en gel de acrilamida).
10. Correr el gel a 1000 V (aprox 25 mA) hasta que el colorante llegue al extremo inferior del gel.
11. Colocar el gel sobre un vidrio y cubrirlo con plástico. Exponerlo a una película fotográfica (aproximadamente 20 seg) a la que previamente se le habían hecho algunas muescas en los bordes. Mientras se expone, marcar sobre el plástico la

posición de la película. Revelarla. Después de revelada, colocarla bajo el vidrio haciéndola coincidir con las marcas.

12. Cortar la banda del gel que contiene el RNA radiactivo sintetizado y colocarla en un tubo eppendorf de 1.5 mL

13. Añadir al tubo:

180 μ L	H ₂ O con DEPC
20 μ L	NaOAc 3 M [pH 5.5] tratado con DEPC
1 μ L	EDTA 0.25 M tratado con DEPC
SDS 20 %	

14. 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 μ L de etanol. Poner el tubo a -20 °C durante 15 min.

15. Recuperar el RNA precipitado centrifugando en una microcentrífuga por 20 min a máxima velocidad. Dejar secar el precipitado y resuspenderlo en 20 μ L de agua tratada con DEPC. Utilizar 2 μ L para medir cuentas Cerenkov. Usar esta solución para el análisis de procesamiento.

9. Entrecruzamiento por luz ultravioleta (UV-crosslinking) de proteínas a RNA.

Este protocolo es adaptado del publicado por Schuster y Gruissem (1990).

Existen varias técnicas que permiten la detección de interacciones entre ácidos nucleicos y proteínas. Entre ellas se encuentra el entrecruzamiento de proteínas a RNA por medio de luz ultravioleta. Este es un método relativamente sencillo comparado con ensayos de retardo de movilidad en gel o de footprinting con DNAsa I, y que permite estimar el tamaño de las proteínas que se unen a los ácidos nucleicos en un extracto proteico. En este ensayo, las proteínas son marcadas indirectamente debido a su unión a los ácidos nucleicos sintetizados in vitro con una marca radioactiva. La irradiación con luz ultravioleta de la mezcla de ácidos nucleicos-proteínas produce radicales de purinas y pirimidinas que pueden unirse covalentemente con algún aminoácido cercano como

cisteína, serina, metionina, lisina, arginina, histidina, triptofano, fenilalanina y tirosina, en los sitios de contacto ácido nucleico-proteína. Después de la irradiación, el DNA o RNA no protegido por la proteína es digerido por nucleasas y las proteínas analizadas por SDS-PAGE y autorradiografía. La especificidad de la unión proteína- ácido nucleico puede determinarse por experimentos de competencia con un exceso de competidor como poli dC o RNA no marcado.

Soluciones

Solución amortiguadora IVT 20X

MgCl ₂	75 mM
DTT	40 mM
KCl	200 Mm

Solución amortiguadora de sonicación (Ver protocolo: Inducción a gran escala y purificación de la proteína 24RNP recombinante bajo condiciones nativas).

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

Mezcla de reacción

Solución amortiguadora IVT 20X	0.75 µL
24RNP µg (variable)	L µL
Solución amortiguadora de sonicación 1X	M µL (L + M = 7.5 µl)
DTT 40 mM	1 µL
X-RNA ~1.25 fmol, 100,000 cpm	X µL
H ₂ O	Y µL (X + Y = 6.5 µL)
Total	15 µL

Procedimiento

Los pasos del protocolo son:

1. Combinar todos los componentes de la mezcla de reacción excepto el X-RNA. Incubar a temperatura ambiente por 5 min. Agregar el X-RNA, mezclar y centrifugar brevemente. Incubar 10 min.

2. Abrir los tubos cuidadosamente y colocarlos en el UV-crosslinker (UVP CL-1000). Operando en el modo Energy dar 1.8 Joules (2 veces 9000 en la escala).
3. Agregar 1 μL de RNAsa A (0.5 - 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e incubar 20 min a 37°C.
4. Agregar 4 μL de solución amortiguadora de carga para geles de acrilamida (Laemmli) (5X) y calentar las muestras a 80-100°C por 1 min. Cargar un gel SDS-PAGE al 15%.
5. Correr el gel a 20 mA a corriente constante hasta que el azul de bromofenol haya alcanzado la base del gel (~2 a 3 h).
6. Cuidadosamente separar las placas de vidrio, remover el gel y teñirlo con plata (Ver técnica: Tinción de proteínas con plata).

10. Tinción de proteínas con plata.

Este protocolo es adaptado del publicado por Schuster y Gruissem (1990).

Soluciones

Solución 1

Metanol	50 % (volumen / volumen)
Acido acético	12 % (volumen / volumen)

Solución 2

Metanol	10 % (volumen / volumen)
Acido acético	5 % (volumen / volumen)

Solución 3 (10X)

$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	10 g/L
HNO_3	2.05 mL/L

Solución 4

Nitrato de plata 12 mM 0.2 g/100 mL (preparar al momento de usarse)

Solución 5

Na_2CO_3 0.28 M	14.8 g en 500 mL
Formaldehído al 37%	0.5 mL/L

Solución 6

Acido acético	3 % (volumen / volumen)
---------------	-------------------------

Solución 7
Glicerol

5 % (volumen / volumen)

Procedimiento

Los pasos a seguir son:

1. Fijar el gel en 25 mL de solución 1: 1 x 5 min y 1 x 10min.
2. Lavar el gel en 25 mL de solución 2: 1 x 5 min y 1 x 10 min.
3. Remojar el gel en 25 mL de solución 3 1X por 15 min.
4. Lavar el gel abundantemente en agua desionizada
5. Remojar el gel en 25 mL de solución 4 (Nitrato de plata) por 15 min.
6. Enjuagar 3 veces en agua desionizada.
7. Lavar el gel rápidamente en dos cambios de 25 mL de solución 5. Agregar una tercer alícuota y permitir que ocurra el revelado. El revelado tarda de 3 a 15 min.
8. Descartar la solución de revelado y detener la reacción agregando 25 mL de la solución 6 por 5 min.
9. Incubar 60 min el gel revelado en solución de secado (Bio-Rad N161-0752).

11. Electroforesis de RNA en gel de acrilamida.

Este protocolo es adaptado del publicado por Schuster y Gruissem (1990).

Soluciones

Solución amortiguadora TBE 10X

Tris-borato (pH 8.0)	0.9 M
EDTA	0.02 M

Solución A

TBE	0.5 X
Urea	7 M
Acrilamida	15% (peso / volumen)
Bis-acrilamida	0.75% (peso / volumen)

Solución B

TBE	0.5 X
Urea	7 M

Persulfato de Amonio (PSA) 20%

TEMED

Formamida para cargar las muestras

Formamida desionizada

xileno de cianol y azul de bromofenol 0.1% (peso / volumen)

Procedimiento

1. Limpiar perfectamente los vidrios donde se preparará el gel de poliacrilamida (18 x 18 x 0.08 cm), son vidrios templados para evitar que se rompan durante la corrida.
2. Para un gel del 5 % mezclar lo siguiente: 4 mL de Solución A, 8 mL de Solución B, 55 μ L APS 20 % y 8 μ L TEMED.
3. Vaciar el gel. Usar TBE 0.5X como solución amortiguadora de corrida.
4. Precorrer el gel a 25 mA hasta que la temperatura sea de 50 °C (o el voltaje sea de 1000, ~20 min). Cargar las muestras de RNA en el gel y correr el gel a 20 mA hasta que el azul de bromofenol empiece 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 transcripción *in vitro*, quitar solamente uno de los vidrios y cubrir el gel con plástico. Continuar con el paso 10 del protocolo de Transcripción *in vitro*.
7. Si se hizo este gel para analizar la actividad de procesamiento de RNA, transferir el gel a papel Whatman 3 MM, cubrirlo con Saran wrap y secar el gel en un secador de geles usando una hoja adicional de papel Whatman 3 MM.
8. Exponer el gel seco a película de Rayos X a -70 °C por 6 a 10 h o toda la noche con una pantalla intensificadora.

12. Aislamiento de cloroplastos de espinaca.

Este protocolo es adaptado del publicado por Schuster y Gruissem (1990).

Extractos de proteínas crudos o parcialmente fraccionados han probado ser poderosas herramientas en el análisis de los factores que regulan la transcripción y el

procesamiento de los RNAs. En plantas un extracto proteico de cloroplastos ha sido utilizado para analizar el procesamiento de los mRNAs plastídicos. En un ensayo de procesamiento *in vitro*, se utiliza un RNA radiactivamente marcado, el cual contiene la región 3' no traducible y es incubado con un extracto proteico de cloroplastos parcialmente purificado (Gruissem *et al.*, 1986). Después de la incubación los RNAs fueron analizados por SDS-PAGE y autorradiografía.

Soluciones

5X GR (para 1 L)

5 mM Na ₄ P ₂ O ₇ · 10 H ₂ O	2.225 g (Disolver en 40 ml de agua hirviendo)
250 mM HEPES	59.58 g
1.65 M Sorbitol	300.6 g
10 mM EDTA	3.72 g
5mM MgCl ₂	1.1016 g
5mM MnCl ₂	0.99 g
H ₂ O	700 mL. Ajustar pH a 6.8 con 6N NaOH)

1M DTT.

Para 5 ml 0.77 g

Prepararlo con agua estéril tratada con DEPC

Glicerol estéril 100%

1X GR

5X GR	100 mL
Agua estéril sin DEPC	400 mL o 395 mL
DTT (10mM)	770 mg o 5 mL de DTT 1M

PCBF

Percoll	100 mL
PEG 6000 u 8000	3.0 g
BSA	1.0 g
Ficoli	1.0 g

Solución amortiguadora A

10 mM Tris pH 7.9
1 mM EDTA
5 mM DTT
H₂O

Gradientes

Cantidades para 4 tubos de plástico transparente de 50 mL, con 25 mL del gradiente de 40% de PCBF y 12.5 mL del gradiente de 80% de PCBF. Considerando que solo se pueden cargar entre 6 y 8 mL de solución de cloroplastos por tubo.

	40% (100 mL)	80% (50 mL)
5X GR	20 mL	10 mL
glutación	6 mg	3 mg
PCBF	40 mL	40 mL
H ₂ O estéril	40 mL	
DTT 1M	1 mL	0.5 mL

Estos gradientes se preparan agregando primero 25 mL de la mezcla de 40% de Percoll empleando una jeringa con aguja y después, con una pipeta Pasteur o con una jeringa con manguerita de HPLC y colocando la punta hasta el fondo, se agrega la fracción de 80%, muy lentamente para evitar que se mezclen las soluciones o que se formen burbujas. Se debe observar la formación de una interfase.

La solución amortiguadora 1X GR puede prepararse con agua deionizada estéril, la solución amortiguadora A deben prepararse con agua desionizada tratada con DEPC posteriormente esterilizarse por autoclave durante 15 min a 15 libras. Asimismo, el material de cristalería debe ser lavado con ácido sulfúrico, enjuagado profusamente con agua de la llave, luego destilada y desionizada, secado y esterilizado en autoclave.

Preparar la noche antes y almacenar a 4°C

1. 1X GR
2. PCBF
3. Se pueden preparar los tubos con la fracción de 40% de Percoll y dejarlos en el cuarto frío. La fracción de 80% se coloca inmediatamente antes de correr el gradiente.

El día del procedimiento

1. Cosechar la espinaca en la mañana. Obtener de 400 a 600 g de láminas foliares de hojas jóvenes (menos de 7.5 cm sin pecíolo). Quitarles el pecíolo y las nervaduras más gruesas, lavarlas con agua fría y centrifugarlas (en centrífuga para ensaladas) para quitarles el exceso de agua. Pesar porciones de entre 60 y 80 g y llevarlas al cuarto frío.
2. Tomar las porciones, cortarlas en trozos más chicos con tijeras y molerlas en una licuadora con 150 mL de 1X GR frío. Dar 3 o 4 pulsos cortos y uno largo como de 10 segundos.
3. El homogenado se filtra a través de 8 capas de gasa previamente humedecida en agua desionizada estéril fría y exprimida lo más posible. La gasa se satura rápidamente por lo que hay que tener varias capas de manta listas. El extracto debe ser colectado en un vaso de precipitado estéril de 1 L. Después de que pasa todo el homogenado, la manta de cielo es exprimida para colectar lo más posible de líquido, sin que los residuos pasen. Estos son desechados.
4. El filtrado es centrifugado a 6000 rpm en un SS34 (rotor de columpio) ó a 8000 rpm en un JA-20 (rotor de ángulo fijo) por 5 min a 4°C en tubos de plástico opaco de 50 mL en volúmenes sobrepuestos (poner 50 mL por tubo, centrifugar, quitar el sobrenadante (SN) y agregar otros 50 mL en el mismo tubo). Para no perder muchos cloroplastos de la pastilla se recomienda decantar el SN lenta y no totalmente para evitar que se pierda parte de la pastilla. Al final de las centrifugaciones quitar el SN con una pipeta de 10 ml estéril para evitar que la pastilla se despegue.
5. Resuspender las pastillas y juntarlas en el mínimo volumen de solución amortiguadora (32 mL es lo adecuado para 4 tubos de gradiente, pero si no se deshacen los grumos es mejor emplear más solución amortiguadora) empleando un pincel de cerdas suaves. Hacerlo suavemente y deshacer todos los grumos ya que luego afectan el gradiente.
6. Para separar los cloroplastos intactos se emplean gradientes discontinuos 80-40% de percoll. Cada tubo del gradiente se carga cuidadosamente con 6 a 8 mL de la

preparación de cloroplastos y se colocan en un rotor de columpio (HB4) o si no en uno de ángulo fijo (JA20). Se centrifugan a 7000 rpm a 4°C por 20 min, sin freno para que el rotor pare lentamente. Los cloroplastos intactos se localizarán en la interfase.

7. Las bandas de cloroplastos intactos son recuperadas independientemente empleando una pipeta Pasteur y colectadas en tubos Corex estériles o de 50 mL de plástico transparente estériles. Se colocan todas las fracciones correspondientes de todos los gradientes juntas.
8. La fracción de cloroplastos intactos es aislada en aproximadamente 15-18 mL de cuatro gradientes (esto puede variar dependiendo de con cuanto tejido se empieza y de cuantos gradientes son necesarios). Los cloroplastos son lavados llenando el tubo con 1X GR y centrifugando a 6000 rpm por 1-2 min a 4°C en un rotor SS34 o a 8000 rpm por 5 min en un rotor JA20. Aspirar la solución amortiguadora después de este lavado. Esta solución amortiguadora queda clara si los cloroplastos no estaban rotos.
9. Los cloroplastos son resuspendidos en 6 mL de solución amortiguadora A y puestos en un homogeneizador de vidrio con émbolo. Los cloroplastos son rotos dando 10 golpes con el émbolo. Se deja sobre hielo por 5 min y se dan otros 10 golpes para asegurar la lisis completa.

RESULTADOS

1. Producción de 24RNP de espinaca recombinante.

a) Inducción a pequeña escala.

Para obtener la proteína 24RNP recombinante se utilizó la cepa M15 transformada con el plásmido pQE-24RNP (que contenía la secuencia de la proteína 24RNP madura de espinaca con una secuencia de histidinas en el amino terminal para etiquetar de la proteína en el vector pQE-30) capaz de ser inducida para sobre-expresar a la proteína (Toledo, 1998).

Con el fin de comprobar que la 24RNP se producía a buenos niveles se realizaron experimentos a pequeña escala para la inducción de la expresión de la 24RNP madura. Además de cultivar las colonias positivas (carril 6) se utilizaron los siguientes controles:

1. M15 sin pQE sin inducir.
2. M15 sin pQE inducida.
3. M15 con pQE sin inducir.
4. M15 con pQE inducida.
5. M15 con pQE-24RNP sin inducir.

A partir de estos cultivos se obtuvieron extractos bacterianos totales y se analizaron en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 15 %, de acuerdo a los protocolos descritos en Materiales y Métodos. Únicamente las bacterias que contenían el pQE con el gen de la 24RNP clonado, en condiciones de inducción, produjeron a la 24RNP (Figura 6). La masa molecular calculada para esta proteína, basándose en su secuencia de aminoácidos, es de 24 kDa, la cual es significativamente más baja que la masa molecular observada en un SDS- PAGE; lo anterior puede atribuirse a la naturaleza de la 24RNP ya que es rica en aminoácidos cargados negativamente (el dominio amino terminal es ácido) lo que parece restringir el pegado del SDS y hace que la proteína migre anómalamente (Takano *et al.*, 1988). Este comportamiento se ha observado en otras proteínas como la N1/N2 que es una proteína de unión a histonas y que tiene un alto contenido de aminoácidos ácidos (Kleinschmidt *et al.*, 1986).

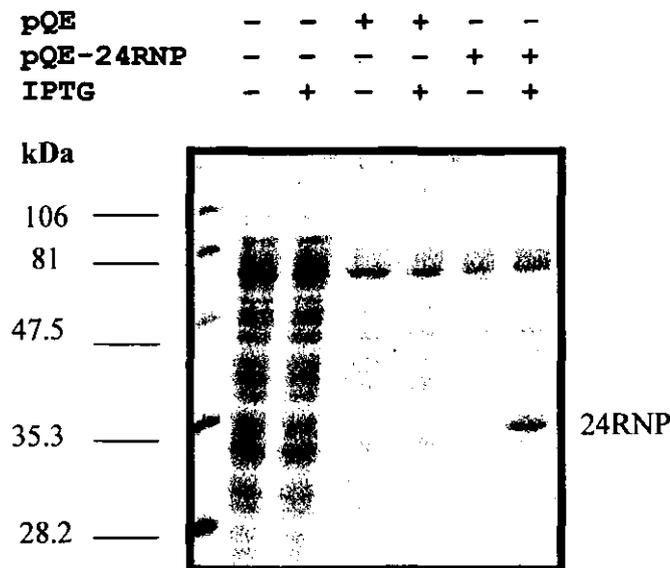


Figura 6. Expresión de la proteína 24RNP recombinante en *E. coli*. La inducción se llevó a cabo con 0.6 mM de IPTG durante 19 h a 28 °C. Se utilizaron alícuotas de 20 µL de cultivos bacterianos con y sin el gen de la 24RNP. Las cuales se analizaron en un gel SDS-PAGE 15% y se tificaron con azul de Coomassie.

b) Inducción de la 24RNP recombinante a gran escala y purificación de la proteína en condiciones nativas.

Una vez que se confirmó a pequeña escala la producción de la 24RNP en *E. coli*, se realizó una inducción a gran escala utilizando 6 mM de IPTG durante 19 hrs a 28 °C. La extracción de la proteína se efectuó en condiciones nativas empleando la solución amortiguadora de fosfatos. La elución de la proteína recombinante de la columna de Ni se realizó empleando un gradiente discontinuo de 20, 50 y 150 mM de imidazol y las diferentes fracciones fueron analizadas en un SDS-PAGE posteriormente teñido con Coomassie. (Figura 7). El análisis densitométrico de la preparación indica que la proteína tiene un (90% de pureza). El rendimiento que se obtuvo fue de 5 mg/L de cultivo. Toda la 24RNP recombinante que se empleó en este trabajo fue tratada con RNAsa y fosfatasa alcalina.

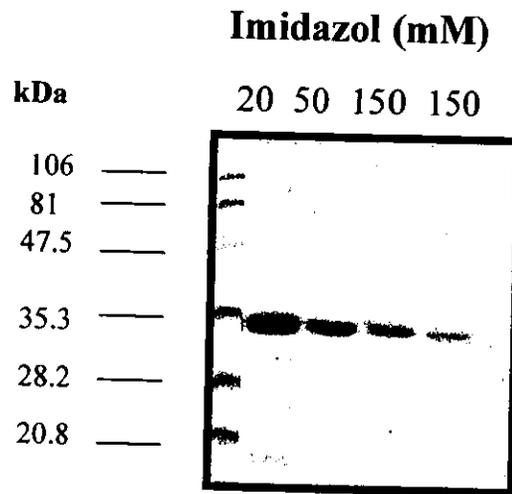


Figura 7. Elución a diferentes concentraciones de imidazol de la proteína 24RNP recombinante de espinaca. Gel SDS-PAGE teñido con Coomassie. Se cargaron 20 μ l de las fracciones eluidas en cada carril.

c) Análisis de la 24RNP por exclusión molecular.

Una preparación de la 24RNP recombinante se pasó a través de una columna de exclusión molecular (Superdex 75) para determinar si la proteína recombinante se encontraba en forma de monómero u oligómero. Los resultados de la elución, muestran que la proteína recombinante puede encontrarse como dímero o como monómero ya que eluye entre las fracciones correspondientes a los marcadores de 45 kDa y de 35kDa (Figura 8).

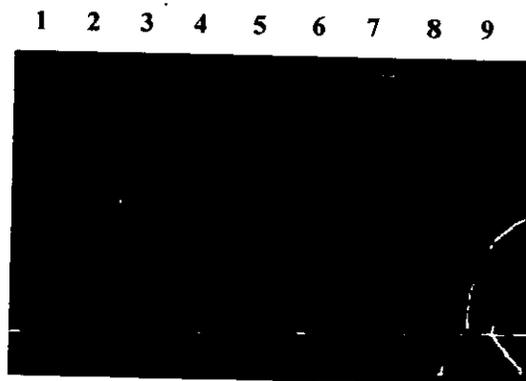


Figura 8. Cromatografía de exclusión molecular para la 24RNP recombinante. Carril 1) Marcadores de masa molecular; 2) Azul dextran; 4) 68 kDa, 6) 45 kDa; 8) 25 kDa; 10) 12 kDa. Gel SDS-PAGE teñido con plata.

d) La 24RNP recombinante conserva sus propiedades de unión a RNA.

Las propiedades de unión de la 24RNP recombinante al extremo 3'UTR de *petD* se determinaron utilizando como competidor, en el ensayo de entrecruzamiento con U.V., albúmina de suero bovino (BSA). La BSA no se une a RNA de *petD* a pesar de encontrarse en un exceso de 50 veces (Figura 9). Solo la 24RNP se une a RNA en ese ensayo.

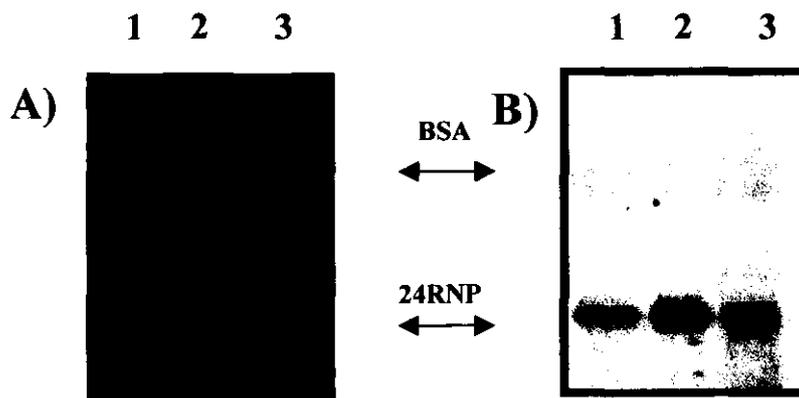


Figura 9. Entrecruzamiento por luz U.V. del extremo 3'UTR de *petD* con 24RNP utilizando como competidor BSA. La 24RNP recombinante: 1) 1 μg 2) 3 μg y 3) 2 μg se incubó en presencia de un exceso de BSA (50X). Las muestras se analizaron en un gel de acrilamida 15 % teñido con nitrato de plata (A) y se hizo una autorradiografía (B).

2. Fosforilación de la 24RNP por una PKC inmunoprecipitada de cerebro de rata.

La 24RNP presenta secuencias consenso de fosforilación para PKC (Figura 5). Para establecer si la 24RNP de espinaca es una proteína capaz de ser fosforilada se estableció un ensayo de fosforilación *in vitro* en el cual la 24RNP recombinante es incubada en presencia de una PKC inmunoprecipitada de cerebro de rata, $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ y Ca^{2+} . Después de la incubación, la 24RNP se analizó por SDS-PAGE y autorradiografía. Se utilizaron como controles: 24RNP sin PKC y la PKC inmunoprecipitada de cerebro de rata sin 24RNP (Figura 10). Los resultados de estos ensayos muestran que la 24RNP recombinante fue fosforilada *in vitro* por una PKC inmunoprecipitada de cerebro de rata (Figura 10).

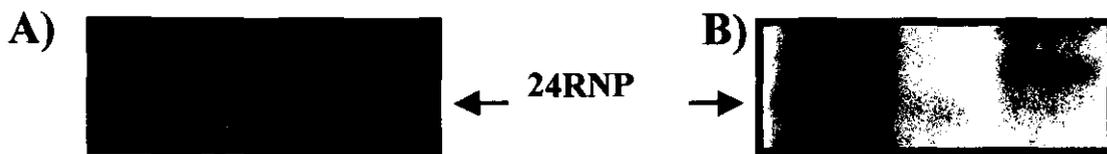


Figura 10. Fosforilación de la 24RNP recombinante por una PKC inmunoprecipitada de cerebro de rata. La 24RNP recombinante (3 μg) se incubó en presencia de una PKC, $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ y 250 μM Ca^{2+} durante 30 min. Las muestras se analizaron en un gel de acrilamida 15 % teñido con Coomassie (A) y se hizo una autorradiografía (B).

3. Fosforilación de la 24RNP por una CDPK.

Al igual que las PKC, las CDPKs son proteín-cinasas dependientes de Ca^{2+} , las cuales se han encontrado exclusivamente en plantas, por lo que se decidió probar si esta enzima era capaz de fosforilar a la 24RNP recombinante. Para ello la 24RNP recombinante se incubó con una CDPK purificada de membrana plasmática de betabel, en una solución amortiguadora que contenía 250 μM de Ca^{2+} y 10 μCi de $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$. Después de la incubación la 24RNP se analizó en un SDS-PAGE y se obtuvo una autorradiografía. Los controles utilizados fueron: 24RNP sin CDPK y 24RNP con CDPK en presencia de 1 mM de EGTA.

Los resultados muestran que la 24RNP recombinante también es fosforilada por una CDPK de betabel en presencia de Ca^{2+} (Figura 11). La dependencia de la actividad de la CDPK por el Ca^{2+} se puede ver al agregar el agente quelante EGTA, la concentración que se utiliza de éste es suficiente para evitar que la fosforilación de la 24RNP se lleve a cabo.

+	+	+	24RNP	+	+	+
-	+	+	CDPK	-	+	+
-	-	+	EGTA	-	-	+

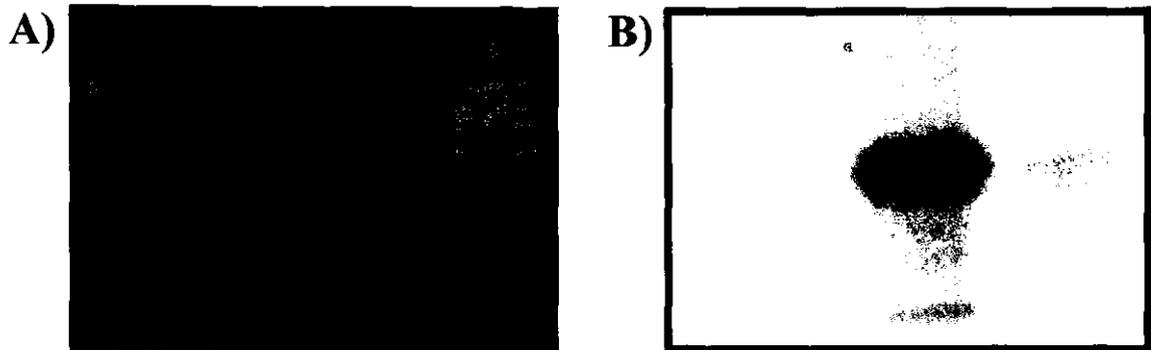


Figura 11. Fosforilación de la 24RNP por una CDPK de betabel. La 24RNP recombinante (5 µg) se incubó 90 min con una CDPK purificada de membrana plasmática de betabel en presencia de 10 µCi [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP y 250 µM Ca^{2+} . La proteína se analizó en un gel de acrilamida 15% teñido con plata (A) y se obtuvo la autorradiografía (B).

4. Ensayo de entrecruzamiento por luz UV de la proteína recombinante 24RNP fosforilada y no fosforilada con el extremo 3'UTR de *petD*.

La 28RNP nativa purificada de cloroplasto no se une por igual a todos los mensajes de cloroplastos ni a todas las regiones del mensaje, y esto se debe a una modificación post-traducciona (fosforilación en la Ser-22 que forma parte del dominio ácido de la proteína), lo que le confiere la especificidad de unión a RNAs en el cloroplasto (Lisitsky y Schuster, 1995). Con base en lo anterior y dado que la 24RNP también es susceptible de ser fosforilada, se decidió probar si la fosforilación de la 24RNP, al igual que la 28RNP, modula su afinidad por RNA.

Existen dos caminos para determinar la afinidad de la 24RNP por el extremo 3'UTR de *petD*: a) mantener constante la concentración de RNA e incrementar la concentración de proteína y b) mantener constante la concentración de proteína y variar la cantidad de RNA.

a) Utilizando cantidades crecientes de proteína.

Diferentes cantidades de 24RNP fosforilada (P-24RNP) y de 24RNP no fosforilada (NP-24RNP) se incubaron con 48 fmoles de RNA del extremo 3'UTR de *petD* marcado con UT³²P. Las muestras fueron analizadas en un gel SDS-PAGE y se obtuvo la autorradiografía correspondiente (Figura 12). Tanto la 24RNP fosforilada como la no-fosforilada muestran un incremento en la unión a RNA que correlacionan con el incremento de proteína. Sin embargo la proteína no-fosforilada muestra una mayor unión por el extremo 3' de *petD*.

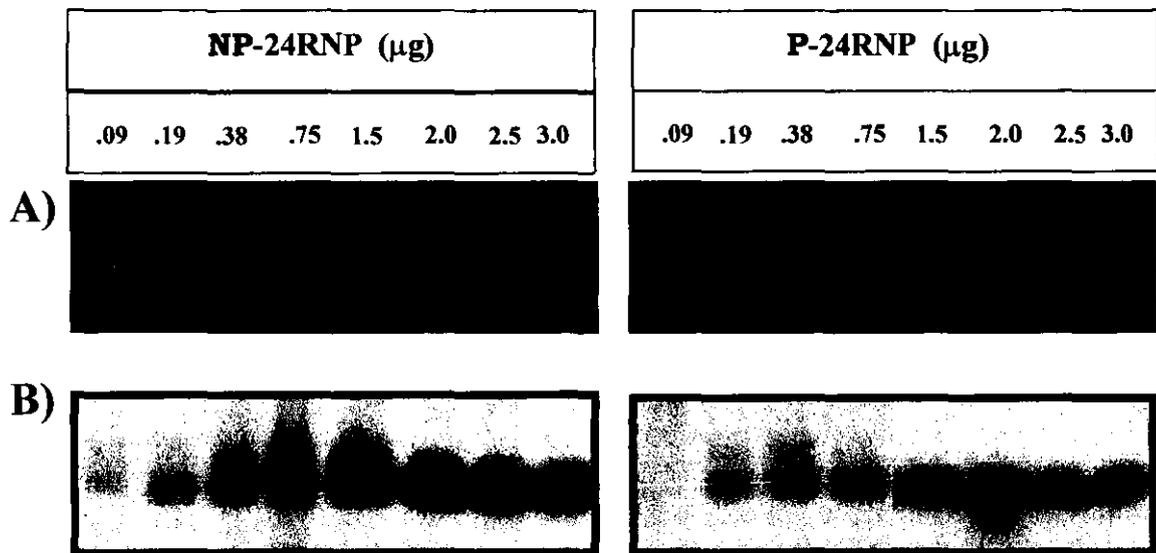


Figura 12. Entrecruzamiento por luz U.V. del extremo 3'UTR de *petD* utilizando cantidades crecientes de la 24RNP. Diferentes cantidades de 24RNP fosforilada (P-24RNP) y no fosforilada (NP-24RNP) se entrecruzaron con 48 fmoles (2.56 nM) de RNA del extremo 3'UTR de *petD* marcado con UT³²P. Gel de acrilamida al 15 % teñido con plata (A) y autorradiografía (B)

El análisis densitométrico de los resultados anteriores permitió realizar la gráfica de la Figura 13. Los valores que se obtuvieron al aplicar la ecuación de Hill fueron: 24RNP no-fosforilada (Constante de disociación relativa) $K'=0.53 \pm 0.05 \mu\text{M}$, (Unión máxima) $B_{\text{máx}}=19.55 \pm 0.74 \text{ dpi}$ y (número de Hill) $H=2.49 \pm 0.51$, mientras que para la 24RNP fosforilada fueron: $K'=0.40 \pm 0.02 \mu\text{M}$, $B_{\text{máx}}=8.53 \pm 0.22 \text{ dpi}$ y $H=3.90 \pm$

0.90. Como podemos observar las K's son semejantes, lo cual indica que la afinidad de la 24RNP fosforilada y no fosforilada, hacia el extremo 3' de *petD*, es la misma. Lo que es diferente es la unión de dichas proteínas (B_{máx}) al extremo 3' de *petD*. El número de Hill indica que en ambas proteínas existe cooperatividad: la cooperatividad en la proteína fosforilada es mayor que la de la no fosforilada; y el número de sitios al que se une la proteína fosforilada es mayor si se le compara con la no fosforilada.

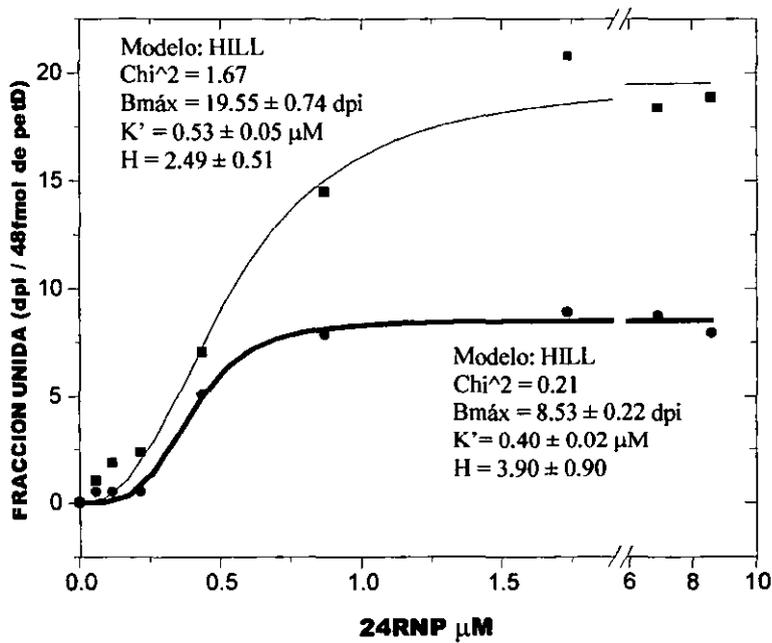


Figura 13. Efecto de la fosforilación de la 24RNP en la unión al extremo 3'UTR de *petD*. Diferentes cantidades de 24RNP fosforilada o no fosforilada se incubaron con 2.56 nM del extremo marcado de 3' *petD*. Se entrecruzaron con luz ultravioleta y se revelaron por autoradiografía. La cuantificación de las muestras se llevó a cabo mediante el scanning de las autorradiografías de dos diferentes experimentos, como el mostrado en la Figura 12. Cuadrados: 24RNP no fosforilada. Círculos: 24RNP fosforilada

b) Utilizando cantidades crecientes de RNA.

Se incubaron 1.5 μg de 24RNP recombinante ya sea fosforilada (P-24RNP) o no-fosforilada (NP-24RNP), con diferentes cantidades del extremo 3'UTR de *petD* marcado con UT^{32}P . Después de 10 min a 25 °C, las reacciones se entrecruzaron con luz UV y se digirieron con ribonucleasa A. Las muestras se cargaron en un gel SDS-

PAGE y se expusieron para obtener la autorradiografía. La unión de la 24RNP fosforilada y no-fosforilada aumenta conforme aumenta la concentración de la proteína (Figura 14). Sin embargo, se observa una mayor unión de la proteína no-fosforilada que de la fosforilada, lo que confirma el resultado anterior (Figuras 12 y 13).

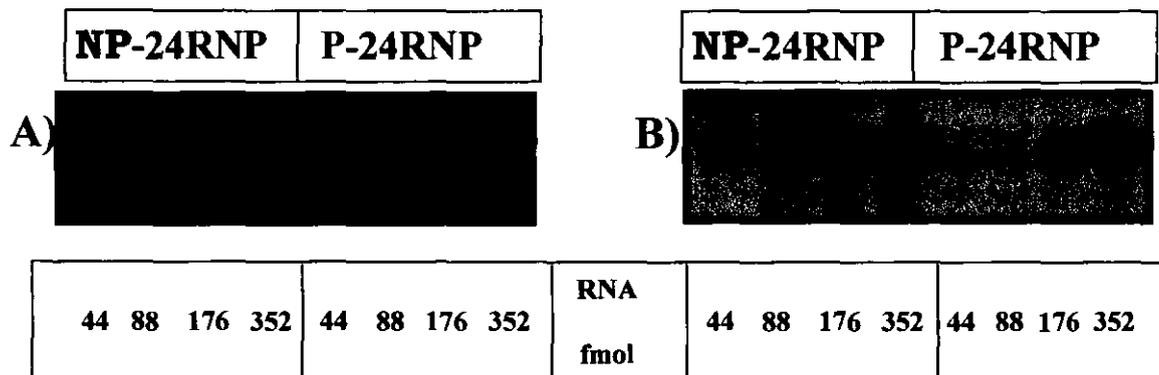


Figura 14. Entrecruzamiento por luz U.V. de la 24RNP recombinante utilizando diferentes cantidades del extremo 3'UTR de *petD*. Diferentes cantidades de RNA del extremo 3'UTR de *petD* marcado con $UT^{32}P$ fueron entrecruzados con U.V. con 1.5 μg (3.33 μM) de 24RNP fosforilada (P-24RNP) o no fosforilada (NP-24RNP). A) Gel de acrilamida 15 %, teñido con plata y B) autorradiografía.

La densitometría de la Figura 14 permitió realizar la gráfica de la Figura 15. Los resultados que se observan en esta gráfica confirman los resultados anteriores en donde se variaba la cantidad de 24RNP; las Kds tanto de la proteína fosforilada como de la no fosforilada son muy parecidas, mientras que la unión de la proteína no fosforilada es dos veces mayor que la unión que presenta la proteína fosforilada.

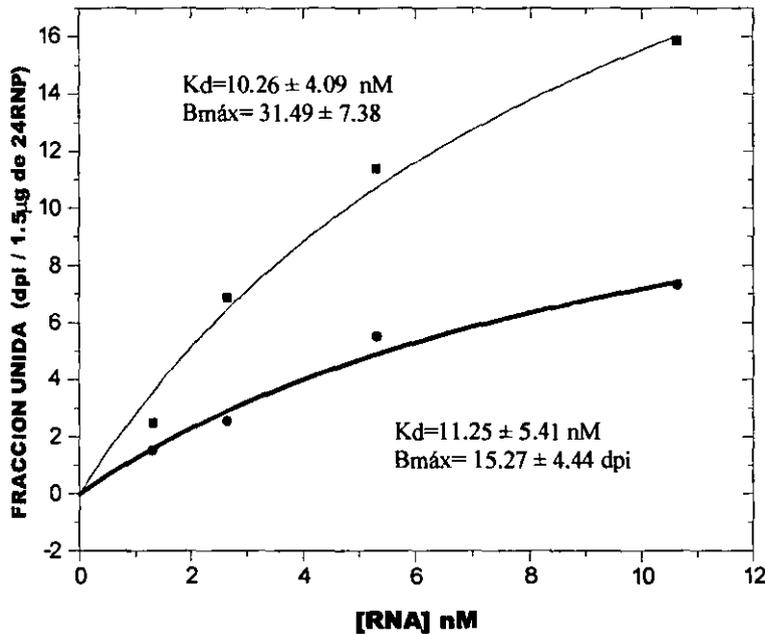


Figura 15. Efecto de la fosforilación de la 24RNP en la unión al extremo 3'UTR de *petD*. Diferentes cantidades de RNA del extremo 3'UTR marcado de *petD* fueron entrecruzados con UV con 1.5 µg (3.33 µM) de 24RNP recombinante fosforilada o no fosforilada. La cuantificación de la unión se llevó a cabo por scanning de las autorradiografías. Cuadrados=: 24RNP no fosforilada. Círculos: 24RNP fosforilada.

5. Inmunoprecipitación de una actividad cinasa a partir de cloroplastos intactos utilizando anti CDPK.

Para encontrar evidencias de que la 24RNP se fosforila *in vivo*, se buscó una actividad cinasa en cloroplastos capaz de fosforilar a la 24RNP. Para ello se aislaron cloroplastos intactos de hojas de espinaca utilizando un gradiente de Percoll. Estos fueron lisados y el extracto fue incubado con proteína A-sefarosa y anticuerpos contra CDPK de betabel durante 1.5 h a 4 °C. La fracción inmunoprecipitada se incubó con 24RNP recombinante, en una solución amortiguadora que contenía Ca^{2+} , $[\gamma^{32}P]ATP$ y ácido okadaico por 1.5 h a 37 °C. Después de la incubación las proteínas fueron separadas en un gel de acrilamida 15 % y transferidas a una membrana. Los controles utilizados fueron los siguientes: extracto de cloroplastos tratado con suero pre-inmune e incubado con la solución amortiguadora de fosforilación y 24RNP y extracto de

cloroplasto con anti-CDPK, la solución amortiguadora de fosforilación, 24RNP y EGTA.

Los resultados muestran que se logró inmunoprecipitar una actividad cinasa de cloroplastos de espinaca capaz de fosforilar a la 24RNP recombinante (Figura 16). La presencia de EGTA no impide la fosforilación de la 24RNP, lo cual sugiere que la concentración de EGTA no fue suficiente para quelar todo el Ca^{2+} en la reacción, o bien que la cinasa que fosforila la 24RNP no es dependiente de Ca^{2+} , podría ser una cinasa relacionada con la familia de las CDPKs, pero que no tiene dominio de unión a Ca^{2+} .

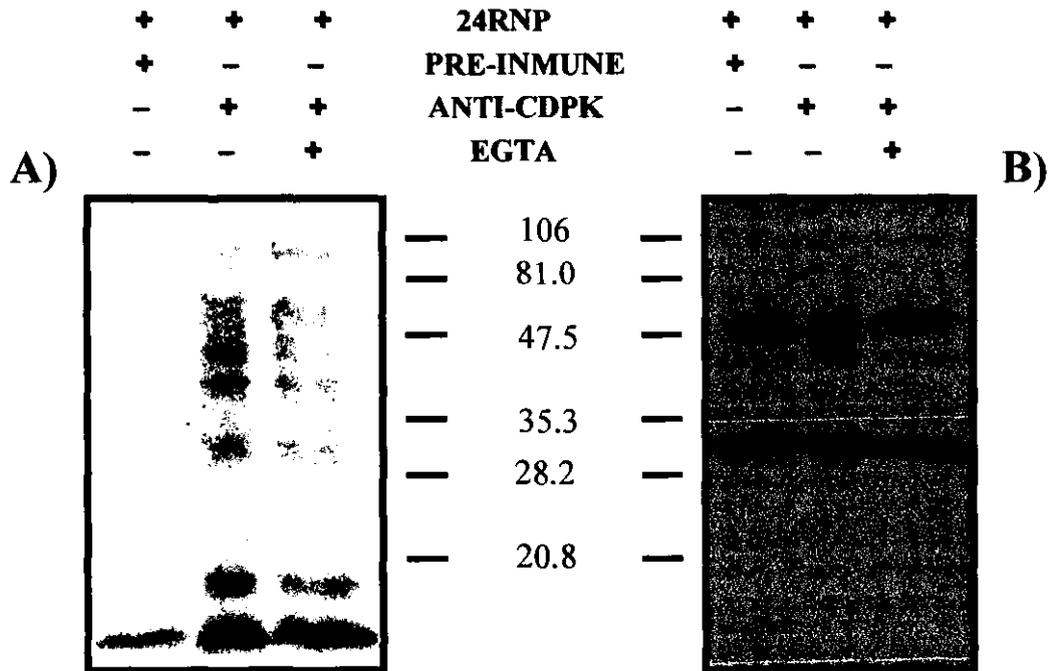


Figura 16. Una actividad cinasa inmunoprecipitada de cloroplastos intactos de espinaca utilizando un anticuerpo contra CDPK de betabel fosforila a la 24RNP recombinante. Cloroplastos intactos de espinaca se lisaron con tritón 1 % y se incubaron con anticuerpo contra CDPK por 90 min a 37 °C. La preparación fue usada en un ensayo de fosforilación *in vitro* empleando la 24RNP recombinante. A) Autorradiografía de las muestras analizadas. B) Western blot con anticuerpos anti 24RNP (dilución 1:15,000).

6. La fosforilación de la 24RNP recombinante realizada por una actividad cinasa inmunoprecipitada de cloroplastos de espinaca también cambia sus propiedades de unión por el 3'UTR de *petD*.

Con el objeto de determinar si la fosforilación de la 24RNP llevada a cabo por la actividad cinasa inmunoprecipitada de cloroplastos de espinaca también altera las propiedades de unión de esta proteína al RNA 3'UTR de *petD* se realizó el siguiente ensayo. Se aislaron cloroplastos intactos de espinaca mediante un gradiente de percoll, se lisaron y el lisado se incubó con anticuerpos contra CDPK, de esta manera se logró inmunoprecipitar una actividad cinasa que se utilizó para fosforilar a la 24RNP recombinante. Después se procedió a entrecruzar el 3'UTR de *petD* tanto con la 24RNP fosforilada, por la actividad cinasa inmunoprecipitada del extracto de cloroplastos, como con la 24RNP tratada con una preparación obtenida de un control en donde se incubó el extracto de cloroplastos con suero pre-inmune. Las proteínas fueron analizadas en un SDS-PAGE y se obtuvo una autorradiografía. Los resultados muestran que la fosforilación de la 24RNP recombinante por la actividad cinasa inmunoprecipitada de cloroplastos de espinaca también cambia la afinidad de la 24RNP por RNA; lo que reafirma los resultados anteriores (Figura 17).

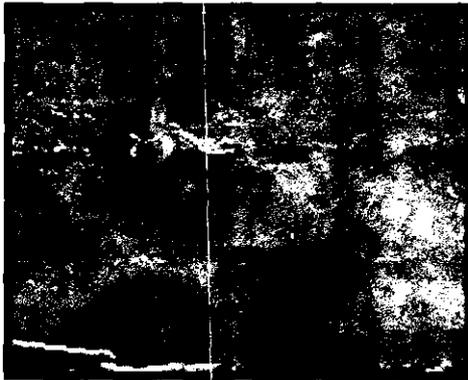
Además en este ensayo podemos observar que la 24RNP está uniéndose al extremo 3'UTR de *petD* en forma de monómero y de dímero, el dímero que se forma en este caso no tiene que ser necesariamente un homodímero, ya que alguna otra proteína que haya inmunoprecipitado con la actividad cinasa puede estar entrecruzándose con el 3'UTR de *petD*.

7. La 24RNP se une en forma de monómero y de homodímero al extremo 3'UTR de *petD*.

Para determinar si la 24RNP se une en forma de heterodímero u homodímero se realizó un ensayo de entrecruzamiento entre la 24RNP fosforilada *in vitro* con CDPK purificada de membrana plasmática de betabel, y la 24RNP defosforilada, lo que se observó es que tanto la 24RNP fosforilada y no fosforilada se unen al transcrito en forma de homodímeros como se observa en la Figura 18.

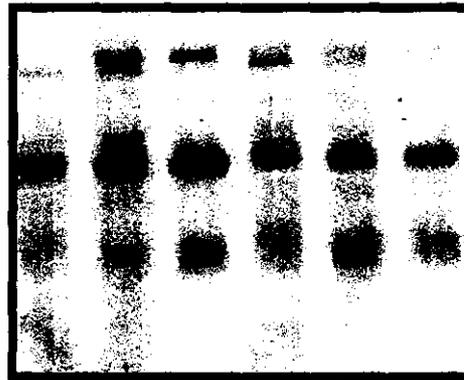
A)

NP-24RNP			P-24RNP		
1X	2X	3X	1X	2X	3X



B)

NP-24RNP			P-24RNP		
1X	2X	3X	1X	2X	3X



C)

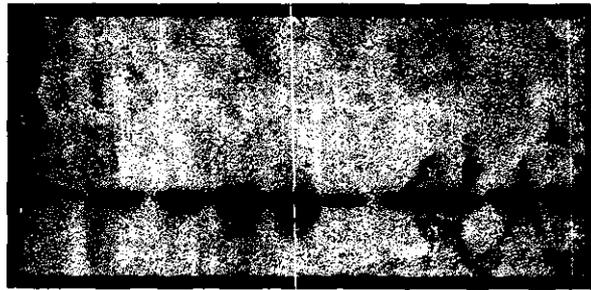
NP-24RNP			P-24RNP		
1X	2X	3X	1X	2X	3X



Figura 17. Entrecruzamiento por luz U.V. de la 24RNP recombinante fosforilada con la actividad cinasa inmunoprecipitada de cloroplastos y el extremo 3'UTR de *petD* Diferentes cantidades de 24RNP fosforilada (P-24RNP) y no fosforilada (NP-24RNP) se entrecruzaron con 48 fmoles de RNA del extremo 3'UTR de *petD* marcado con UT³²P. A) Gel de acrilamida 15 %, teñido con plata y B) autorradiografía C) Western blot.

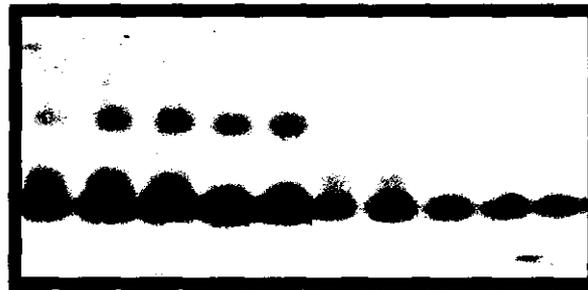
A)

NP-24RNP					P-24RNP				
.35	.75	1.5	2.2	3.0	.35	.75	1.5	2.2	3.0



B)

NP-24RNP					P-24RNP				
.35	.75	1.5	2.2	3.0	.35	.75	1.5	2.2	3.0



C)

NP-24RNP					P-24RNP				
.35	.75	1.5	2.2	3.0	.35	.75	1.5	2.2	3.0



Figura 18. Entrecruzamiento por luz U.V. del extremo 3'UTR de *petD* utilizando cantidades crecientes de la 24RNP. Diferentes cantidades de 24RNP fosforilada (P-24RNP) y no fosforilada (NP-24RNP) se entrecruzaron con 48 fmoles de RNA del extremo 3'UTR de *petD* marcado con $UT^{32}P$. Gel de acrilamida al 15 % teñido con plata (A), autorradiografía (B) y sobre-exposición de la autorradiografía (C).

DISCUSION

1. Producción de la 24RNP de espinaca recombinante en *E. coli*.

El sistema pQE es una de las mejores opciones para obtener proteína recombinante, ya que posee un represor bastante fuerte que evita la expresión del gen clonado hasta su inducción con IPTG. La importancia de tener un buen sistema de represión se observa sobre todo, cuando se trabaja con proteínas que pueden ser tóxicas y al haber fugas en la expresión de los vectores, ya que se puede provocar muerte celular (Toledo, 1998).

El vector pQE fue elegido para la clonación de la 24RNP debido a que este sistema brinda un alto rendimiento en la generación de proteínas recombinantes (de 5-20 mg/L de cultivo) (Wienk y Kruijff, 1999; Li y Ram, 1999). En este caso se lograron obtener 5.0 mg de 24RNP soluble/L de cultivo, lo cual fue un gran avance ya que anteriormente se obtenía un rendimiento de solamente 1 mg de 24RNP soluble/L de cultivo (Toledo, 1998), esto ocurría porque la proteína formaba cuerpos de inclusión, los cuales son agregados de proteína insoluble y de RNA que contienen la mayor parte de la proteína que se expresa (Schein, 1989).

La importancia de obtener la proteína soluble para este trabajo, radicaba en que se buscaba establecer si la proteína sufría una fosforilación y para ello se requería que la proteína estuviese en su forma nativa. Como se ha demostrado para el represor Lac marcado con una etiqueta de His (Owens *et al.*, 2001) y para las proteínas recombinantes sintasa endoperoxidasa prostaglandina 1 y 2 de humano marcadas con una etiqueta de His (Smith T, *et al.* 2000), la proteína en forma soluble es la que se encuentra en su estado nativo.

Para producir la mayor cantidad de proteína soluble se modificó la temperatura, ya que debido a razones no muy bien comprendidas, se sabe que la temperatura afecta directamente los niveles de expresión y solubilidad de la proteína. Generalmente las temperaturas altas (37° - 42°C) promueven la formación de cuerpos de inclusión; mientras que a temperaturas bajas (27 - 30°C) las proteínas se mantienen solubles (Bishia *et al.*, 1987).

La etiqueta de histidinas de la 24RNP ayudó a la purificación de la proteína, que se realizó de manera relativamente sencilla, obteniéndose la proteína con más de un 90% de pureza la cual fue suficiente para efectuar los experimentos posteriores. Las ventajas de utilizar esta etiqueta de histidinas son que consiste tan solo de seis residuos consecutivos, su pequeño tamaño implica que existe una adición mínima de aminoácidos extra a la proteína recombinante y esta etiqueta no es inmunogénica, o es pobremente inmunogénica en todas las especies, excepto en algunos monos (QIAGEN). Además la etiqueta de His no se encuentra cargada a pH fisiológico y generalmente no afecta la compartimentalización, la secreción, o el plegamiento de la proteína a la cual se ha unido (QIAGEN).

En más de 150 proteínas que se purificaron utilizando este sistema nunca se encontró que la etiqueta de seis His interfiriera con la estructura o función de la proteína (Hoffman, 1991). Esto se ha examinado para una amplia variedad de proteínas, incluyendo enzimas (Döbeli *et al.*, 1990), factores de transcripción (Janknecht *et al.*, 1991), antígenos (Stüber *et al.*, 1990, Takacs y Gerard, 1991) y proteínas de membrana (Meyer).

2. La 24RNP es fosforilada *in vitro* por cinasas dependientes de Ca^{2+} .

La 28RNP es capaz de ser fosforilada ya sea *in vivo*, cuando los cloroplastos intactos se ponen en presencia de [^{32}P]-ortofosfato, o *in vitro*, donde la 28RNP recombinante es un excelente sustrato para la subunidad α recombinante de la casein-cinasa II de maíz (CK-II) (Lisitsky y Schuster, 1995). Interesantemente la 24RNP, a pesar de presentar una alta identidad (57%) con la 28RNP, no es fosforilada por dicha cinasa en los ensayos de fosforilación *in vitro* (Lisitsky y Schuster, 1995). Sin embargo, además de los sitios consenso que presenta la 24RNP para la CK-II, ésta tiene sitios para la proteína-cinasa dependiente de calcio (PKC) (Figura 5); por lo que se decidió probar si una PKC dependiente de Ca^{2+} inmunoprecipitada de cerebro de rata era capaz de fosforilarla y se encontró que efectivamente la 24RNP es sustrato *in vitro* para la PKC (Figura 10).

Las CDPKs al igual que las PKCs son cinasas dependientes de Ca^{2+} , pero a diferencia de estas últimas las CDPKs solo se han reportado en plantas (Harmon *et al.*, 2000). Por lo tanto, se decidió probar si la 24RNP era también sustrato para una CDPK dependiente de Ca^{2+} purificada de membrana plasmática de betabel. Y lo que se demostró es que la 24RNP es fosforilada por dicha CDPK (Figura 11) y que esta fosforilación se inhibe en presencia de EGTA, lo que confirma que la actividad cinasa es dependiente de calcio y muestra claramente que la fosforilación *in vitro* de la 24RNP es llevada a cabo por cinasas dependientes de Ca^{2+} . Dicha fosforilación puede estar cambiando la conformación de la 24RNP y modulando su función *in vivo*.

3. Una actividad cinasa inmunoprecipitada de cloroplastos de espinaca es capaz de fosforilar a la 24RNP.

Una actividad cinasa capaz de fosforilar a la 24RNP fue inmunoprecipitada de cloroplastos de espinaca con suero inmune anti CDPK, lo cual podría indicar, que la 24RNP requiere ser fosforilada *in vivo* para modular su unión a RNA. Sorprendentemente la actividad cinasa inmunoprecipitada de cloroplastos no se inhibe en presencia de EGTA (Figura 16 carril 3). Lo anterior puede deberse a que la cinasa inmunoprecipitada sea una CRK (proteín-cinasa relacionada con CDPK), y que presente una actividad cinasa independiente de Ca^{2+} ; lo que de hecho ocurre en una CRK de maíz (Furumoto *et al.*, 1996). El que esta cinasa no responda a Ca^{2+} puede explicarse porque las CRKs presentan un dominio CaM (calmodulina like) degenerado y es en este dominio donde se une el Ca^{2+} (Lindzen y Choi, 1995).

Es importante mencionar que al tratar de inmunodetectar mediante Western - Blot a la cinasa inmunoprecipitada de cloroplastos no se logró observar la banda correspondiente (datos no mostrados) por lo que puede tratarse de una fosforilación inespecífica, es decir que el anticuerpo agregado al extracto cloroplástico se encuentre en exceso y esto ocasionó que se haya unido inespecíficamente a alguna cinasa que no es una CDPK, lo cual explicaría porque la cinasa no es dependiente de Ca^{2+} . Por lo que no podemos decir que clase de cinasa es la que se está inmunoprecipitando ni a que

familia pertenece ya que se requiere de más trabajo experimental para llegar a una conclusión clara. Sin embargo es indudable que se inmunoprecipitó una proteína con actividad de cinasa capaz de fosforilar a la 24RNP.

4. La fosforilación cambia las propiedades de unión de la 24RNP de espinaca por el extremo 3'UTR de *petD*.

La 24RNP es fosforilada *in vitro* por la CDPK y esta modificación, aunque no cambia la afinidad de la proteína, da como resultado un cambio en su unión al extremo 3'UTR de *petD*, la proteína en su forma fosforilada se une dos veces menos. Esto puede deberse a: que la proteína no fosforilada se une de manera inespecífica al RNA y al fosforilar la 24RNP sufre un cambio conformacional que hace que la unión sea específica, o bien, que la fosforilación de la 24RNP disminuye el número de uridinas a las que se puede entrecruzar y/o proteger de la digestión de la ribonucleasa debido también a un cambio conformacional generado por la fosforilación.

Se utilizó la 24RNP fosforilada por la actividad cinasa inmunoprecipitada de cloroplastos para analizar sus propiedades de unión al extremo 3'UTR de *petD* de mRNA y los resultados obtenidos en este ensayo confirman lo observado previamente al fosforilar a la 24RNP con CDPK, es decir, que la unión de la 24RNP fosforilada al extremo 3' de *petD* es menor que cuando no existe esta modificación.

Se puede especular que la fosforilación/defosforilación de proteínas es un mecanismo por medio del cual las propiedades de unión al RNA son moduladas en cloroplasto, ya que tanto la 24RNP como la 28RNP sufren fosforilaciones que disminuyen su unión por el extremo 3'UTR de *psbA* (Lisitsky y Schuster, 1995). Es probable que la fosforilación que sufren estas proteínas resulte en un cambio conformacional que les permita interactuar con otras RNPs y otras proteínas como RNasas, que específicamente corten el pre-mRNA. Por lo que la fosforilación de la 24RNP podría estar afectando el correcto procesamiento de los extremos 3'UTR. Se requieren más estudios para determinar cual es el papel de dicha fosforilación en el procesamiento post-transcripcional en cloroplastos.

Otro dato interesante se observó cuando la 24RNP se pasó a través de una columna de exclusión molecular, ya que los resultados muestran que la proteína es capaz de interactuar consigo misma para formar dímeros. Que la proteína se encuentra en forma de dímero lo confirman los ensayos de entrecruzamiento con UV donde la 24RNP forma homodímeros que se entrecruzan con el extremo 3'UTR de *petD*. La unión de estos homodímeros es también dependiente del estado de fosforilación de la proteína recombinante, es decir, los dímeros de la proteína no fosforilada unen más RNA que los de la proteína fosforilada (Figura 17 y 18).

Se requieren más estudios para determinar si la 24RNP además de interactuar consigo misma está interactuando con otras proteínas presentes en el extracto de procesamiento formando heterodímeros. En mamíferos se ha demostrado que la hnRNP A1, además de interactuar consigo misma, establece contactos específicos con otras hnRNP. (Cartegni, 1996)

La interacción de la 24RNP consigo misma podría estar jugando un papel muy importante, por ejemplo en modular la unión de otras proteínas a secuencias adyacentes del mRNA y/o en reclutar otras proteínas que pudiesen ser importantes para el procesamiento del extremo 3'. Es necesario llevar a cabo más estudios para poder determinar la influencia de las interacciones de las RNPs en el procesamiento del extremo 3' del mRNA.

CONCLUSIONES

1. En este trabajo se demostró que la 24RNP recombinante de espinaca es fosforilada *in vitro*, tanto por una PKC inmunoprecipitada de cerebro de rata, como por una CDPK purificada de membrana plasmática de betabel.
2. La fosforilación de la 24RNP da como resultado un cambio en la unión de la proteína al extremo 3'UTR de *petD*, específicamente, la fosforilación causa una menor unión por el RNA.
3. Se logró inmunoprecipitar una actividad cinasa de cloroplastos de espinaca capaz de fosforilar a la 24RNP recombinante *in vitro*.
4. Las propiedades de unión de la 24RNP también se ven afectadas cuando la proteína es fosforilada por la actividad cinasa inmunoprecipitada de cloroplastos.
5. Se determinó que la 24RNP interacciona consigo misma, formando dímeros.

PERSPECTIVAS

1. Sería conveniente probar si la unión de la 24RNP fosforilada y no fosforilada a otros extremo 3'UTRs varía de manera semejante a como ocurre con *petD*.
2. Sería importante determinar cuáles aminoácidos son los que se fosforilan en la 24RNP, y después hacer mutagénesis sitio dirigida de dichos residuos para determinar si están participando en la unión a RNA, o bien en la interacción con otras proteínas.
3. El que la 24RNP esté reconociendo secuencias específicas o no, podría depender de si está o no fosforilada la proteína.
4. Saber si la fosforilación de la proteína tiene algo que ver con su oligomerización y si la proteína se une preferencialmente en forma de monómero o algún oligómero.

BIBLIOGRAFIA

- 1- **Albá M and Pagés M. 1998.** Plant proteins containing the RNA-recognition motif. *TIPS*. 3: 15-21
- 2- **Audersik T and Audersik G. 1997.** Biología, 4ª edición, Prentice Hall, Mexico. 947 p.
- 3- **Avis J, Allain FH-T, Howe PWA, Varani G, Neuhaus D, Nagai K. 1996.** Solution structure of the N-terminal RNP domain of U1A protein: the role of C-terminal residues in structure stability and RNA binding. *J. Mol. Biol.* 257: 398-411.
- 4- **Bandziulis RJ, Swanson MS, Dreyfuss G. 1989.** RNA-binding proteins as developmental regulators. *Genes and Dev.* 3: 431-7.
- 5- **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.
- 6- **Bendich AJ. 1987.** Why do chloroplasts and mitochondria contain so many copies of their genome?. *Bio. Essays* 6: 279-82.
- 7- **Bishia WR, Rappuoli R, Murphy JR, 1987.** High-level expression of a proteolytically sensitive diphtheria toxin fragment in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 169: 5140-5151.
- 8- **Bradford M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- 9- **Camoni L, Harper J, Palmgren M. 1998.** 14-3-3 proteins activate a plant calcium-dependent protein kinase. *FEBS Lett.* 430: 381-384
- 10- **Carle-Urioste JC, Ko CH, Benito MI, Walbot V. 1994.** In vivo analysis of intron processing using splicing-dependent reporter gene assays. *Plant Mol. Biol.* 26: 1785-95.

- 11- **Cartegni L, Maconi M, Morandi E, Cobianchi F, Riva S, Biamonti G. 1996.** hnRNP A1 selectively interacts through its Gly-rich domain with different RNA-binding proteins. *JMB.* 259: 337-348.
- 12- **Causton H, Pand B, McLaren RS, Higgins CF: 1994.** mRNA degradation in *Escherichia coli*: a novel factor which impedes the exonuclease activity of PNPase at stem-loop structures. *Mol. Microb.* 14: 731-741.
- 13- **Chaudhuri S and Maliga P. 1996** Sequences directing C to U editing of the plastid psbL mRNA are located within a 22 nucleotide segment spanning the editing site. *EMBO J.* 15: 5958-64.
- 14- **Chen HC and Stern DB. 1991.** Specific binding of chloroplast proteins *in vitro* to the 3' untranslated region of spinach chloroplast *petD* mRNA. *Mol. Cell. Biol.* 11: 4380-8.
- 15- **Clark SE, Williams RW, Meyerowitz Em. 1997.** The CLAVATA1 gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot floral meristem size in *Arabidopsis*. *Cell* 89: 575-585.
- 16- **Cook WB and Walker JC. 1992.** Identification of a maize nucleic acid-binding protein (NBP) belonging to a family of nuclear-encoded chloroplast proteins. *Nucl. Acids. Res.* 20: 359-364.
- 17- **Cusack S. 1999.** RNA-protein complexes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9: 66-73.
- 18- **Danon A and Mayfield SP. 1991.** Light regulated translational activators: identification of chloroplast gene specific mRNA binding proteins. *EMBO J.* 10: 3993-4001.
- 19- **Danon A and Mayfield SP. 1994.** ADP-dependent phosphorylation regulates RNA-binding *in vitro*: implications in light-modulated translation. *EMBO J.* 13: 2227-35.
- 20- **Deng XW and Gruissem W. 1987.** Control of plastid gene expression during development in non-photosynthetic plastid of higher plants. *EMBO J.* 7: 3301-3308
- 21- **Deng XW and Gruissem W. 1988.** Constitutive transcription and regulation of gene expression during development: the limited role of transcriptional regulation. *Cell* 49: 379-387.

- 22- **Döbeli H, Trecziak A, Gillessen D, Matile H, Srivastava IK, Perrin LH, Jakob PE, Certa U. 1990.** Expression, purification, biochemical characterization and inhibition of recombinant *Plasmodium falciparum* aldolase. *Mol. Biochem. Parasitol.* 41:259-268.
- 23- **Furumoto T, Ogawa N, Hata S, Izui K. 1996.** Plant calcium-dependent protein kinase-related kinases (CRKs) do not require calcium for their activities. *FEBS Lett.* 396: 147-51.
- 24- **Garrett DS, Lodi PJ, Shamooy Y, Williams KR, Clore GM, Gronenborn AM. 1994.** Determination of the secondary structure and folding topology of an RNA binding domain of mammalian hnRNP A1 protein using three-dimensional heteronuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* 33: 2854-58.
- 25- **Girard-Bascou J, Pierre Y, Drapier D. 1992.** A nuclear mutation affects the synthesis of the chloroplast psbA gene production *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr. Genet.* 22: 47-52.
- 26- **Gribskov M, Fana F, Harper J, Hope DA, Harmon AC, Smith DW, Tax FE, Zhang G. 2001.** PlantsP: a functional genomics database for plant phosphorylation. *Nucleic. Acids Res.* 29: 111-3.
- 27- **Gruissem W. 1989.** Chloroplast gene expression : how plants turn their plastids on. *Cell* 56: 161-170.
- 28- **Gruissem W, Barkan A, Deng XW and Stern D. 1988.** Transcriptional and post-transcriptional control of plastid mRNA levels in higher plants. *TIG.* 49: 258-263.
- 29- **Gruissem W, Barkan A, Deng X and Stern D. 1998** Reviews Transcriptional and post-transcriptional control of plastid mRNA levels in higher plants. *TIG.* 4: 258-263.
- 30- **Gustin MC, Albertyn J, Alexander M, Davenport K. 1998.** *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 1264-1300.
- 31- **Gutiérrez R, MacIntosh G, Green P. 1999.** Current perspectives on mRNA stability in plants: multiple levels and mechanisms of control. *TIPS.* 4: 429-438.
- 32- **Harlow D and Lane D (Eds). 1989.** Antibodies, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Lab. 584 pp.

- 33- **Harmon A, Gribskov M, Harper J. 2000.** CDPKs – a kinase for every Ca²⁺ signal. *TIPS*. 5: 154-159.
- 34- **Harper JF, Huang JF, Lloyd SJ. 1994.** Genetic identification of an autoinhibitor in CDPK, a protein kinase with a calmoduline-like domain. *Biochemistry* 33: 7267-7277.
- 35- **Hayes R; Kudla J; Schuster G; Gabay L; Maliga P, Gruissem W. 1996** Chloroplast mRNA 3' end processing by a high molecular weight protein complex is regulated by nuclear-encoded RNA-binding proteins. *EMBO J*. 15: 7137-46.
- 36- **Hoffman A and Roeder RG. 1991.** Purification of His-tagged proteins in non-denaturing conditions suggest a convenient method for protein interaction studies. *Nucleic. Acids Res.* 19: 6337-6338.
- 37- **Hoffman DW, Query CC, Golden BL, White SW, Keene JD. 1991.** RNA-binding domain of the A protein component of the U1 small nuclear ribonucleoprotein analyzed by RMN spectroscopy is structurally similar to ribosomal proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 83: 2495-99.
- 38- **Howe PWA, Nagai K, Neuhaus D, Varani G. 1994.** NMR studies of U1 snRNA recognition by the N-terminal RNP domain of the human U1A protein. *EMBO J*. 13: 3873-81.
- 39- **Huang H, Liao J, Cohen S. 1998.** Poly(A) and poly(U) specific RNA 3' tail shortening band E. coli RNase E. *Nature* 391: 99-102.
- 40- **Huang JF, Teyton L, Harper JF. 1996.** Activation of Ca²⁺-dependent protein kinase involves intramolecular binding of a calmodulin-like regulatory domain. *Biochemistry* 35: 13222-13230.
- 41- **Janknecht R, de Martynoff G, Lou J, Hipskind RA, Nordheim A, Stunnenberg HG. 1991.** Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus. *PNAS*. 88: 8972-8976.
- 42- **Kanekatsu M. 1995.** Chloroplast Ribonucleoproteins (RNPs) as Phosphate Acceptors for Casein Kinase II: Purification by ssDNA-Cellulose Column Chromatography. *Plant Cell Physiol*. 36: 1649-1656.

- 43- **Kim KN, Cheong YH, Gupta R, Luan S. 2000.** Interaction specificity of *Arabidopsis* calcineurin B-like calcium sensors and their target kinases. *Plant Physiol.* 124: 1844-53.
- 44- **Klauff P and Gruissem W. 1991.** Changes in chloroplast mRNA stability during leaf development. *Plant Cell* 3: 517-529.
- 45- **Klein RR and Mullet JE. 1987.** Control of gene expression during higher plant chloroplast biogenesis. Protein synthesis and transcription levels *psbA*, *psaA-psaB* and *rbcL* in dark-grown and illuminated barley seedlings. *J. Biol. Chem.* 256: 1895-1906.
- 46- **Klein RR, Mason HS, Mullet JE. 1988.** Light-regulated translation of chloroplast proteins. I. Transcripts of *psaA-psaB*, *psbA*, and *rbcL* are associated with polysomes in dark-grown and illuminated barley seedlings. *J. Cell. Biol.* 106: 289-301.
- 47- **Kleinschmidt JA, Digwall C, Maier G, Franke W. 1986.** Molecular characterization of a karyophilic, histone-binding protein: cDNA cloning, amino acid sequence and expression of nuclear protein N1/N2 of *Xenopus laevis*. *EMBO J.* 5: 3547-3552.
- 48- **Laemmli UK. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- 49- **Li L and Ram B. 1999.** High-level expression, purification, and characterization of recombinant type a Botulinum neurotoxin light chain. *Protein Expr. Purif.* 17: 339-344
- 50- **Li Y and Sugiura M. 1990.** Three distinct ribonucleoproteins from tobacco chloroplast: each contains a unique amino terminal acidic domain and two ribonucleoproteins consensus motifs. *EMBO J.* 9: 3059-3066.
- 51- **Lindzen E and Choi JH. 1995.** A carrot cDNA encoding an atypical protein kinase homologous to plant calcium-dependent protein kinases. *Plant Mol. Biol.* 28: 785-97.
- 52- **Lisitsky I, Liveanu V, Schuster G. 1994.** RNA-binding activities of the different domains of a spinach chloroplast ribonucleoprotein. *Nucleic. Acids Res.* 22: 4719-4724

- 53- **Lisitsky I and Schuster G. 1995.** Phosphorylation of chloroplast RNA-binding protein changes its affinity to RNA. *Nucleic. Acids Res.* 23: 2506-2511
- 54- **Littauer UZ and Soreq H. 1982.** Polynucleotide phosphorylase. In: *The Enzymes.* Academic Press NY, Boeyer PD (Ed) Vol. 15 p. 517-553.
- 55- **Llere K and Link G. 1997.** Chloroplast endoribonuclease p54 involved in RNA 3' end processing is regulated by phosphorylation and redox state. *Plant Cell Physiol. and Mol. Biol.* 25: 2404-2408.
- 56- **Lu J and Hall KB. 1995.** An RBD that does not bind RNA: NMR secondary structure determination and biochemical properties of the C-terminal RNA binding domain from the human U1A protein. *J. Mol. Biol.* 247: 739-52.
- 57- **Maier RM, Zeltz P, Kossel H, Bonnard G, Gualberto JM, Grienenberger JM. 1996.** RNA editing in plant mitochondria and chloroplasts. *Plant Mol. Biol.* 32: 343-65.
- 58- **Malnoe P, Mayfield SP, Rochaix JD. 1988.** Comparative analysis of the biogenesis of photosystem II in the wild-type and Y-1 mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Cell Biol.* 106: 609-16.
- 59- **Mc Dowalld KJ, Kaberdin VR, Wu WS, Cohen S, Lin-chao S. 1995.** Site specific RNase E cleavage of oligonucleotides and inhibition of stem-loops. *Nature* 374: 287-290.
- 60- **Mullet J. 1988.** Ann Rev Plant Physiol. Plant Mol Biol. 39: 475-502.
- 61- **Mullet J. 1993.** Dynamic regulation of chloroplast transcription. *Plant Physiol.* 103: 309-313.
- 62- **Mullet J and Klein R. 1987.** Transcription and RNA stability are important determinants of higher plant chloroplast RNA levels. *EMBO J.* 60: 1571-1579
- 63- **Mizoguchi T, Ivhimura K, Shinosaki K. 1997.** *Trends Biotechnol.* 15: 204-231.
- 64- **Nickelsen J and Link G. 1991.** *Mol. Genet.* 228: 89-96.
- 65- **Nickelsen J and Link G. 1993.** *Plant J.* 3: 537-544.
- 66- **Otha 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.

- 67- **Owens RM, Grant A, Davies N and O'Connor D. 2001.** Copurification of the Lac Repressor with Polyhistidine-Tagged Proteins in Immobilized Metal. Affinity Chromatography. *Protein Expr. Purif.* 21: 352-360.
- 68- **Palmer JD. 1990.** Contrasting modes of genome evolution in land plants organelles. *TIG* 6: 69-77.
- 69- **QIAGEN Inc. 1992.** "The QIAexpressionist" second Edition QIAGEN Inc. CA USA.
- 70- **Rochaix JD, Kuchka M, Mayfield S, Schirmer-Rahire M, Girard-Bascou J, Bennoun P. 1989.** Nuclear and chloroplast mutations affect the synthesis or stability of the chloroplast psbC gene product in *Chlamydomonas reinhardtii*. *EMBO J.* 8: 1013-21.
- 71- **Schein CH. 1989.** Production of soluble recombinant proteins in bacteria. *Biotechnology.* 7: 1141-1149.
- 72- **Schnell, D. Smith, M. Chen, K. 1996.** Origin and Evolution of the Related Organelles: Mitochondrion, Chloroplast, and Peroxisome. Web Site: <http://biology-newark.rutgers.edu/Schnell/schnell.html>.
- 73- **Schuster, G y Gruissem, W. 1991.** Chloroplast mRNA 3' end processing requires a nuclear-encoded RNA-binding protein *EMBO J.* 8: 4163-4170.
- 74- **Schuster G and Lisitsky I. 1999.** Polyadenylation and degradation of mRNA in the chloroplast. *Plant Physiol.* 120: 937-944.
- 75- **Sexton TB, Christopher DA, Mullet JE. 1990.** Light induced switch in barley *psbD-psbC* promoter utilization: a novel mechanism regulating chloroplast gene expression. *EMBO J.* 9: 4483-4494.
- 76- **Smith H. 1997** The Molecular Biology of Plant Cells UK.
- 77- **Smith T, Leipprandt J, DeWitt D. 2000.** Purification and Characterization of the Human Recombinant Histidine-Tagged Prostaglandin Endoperoxide H Synthases-1 and -2. *Arch. Biochem. Biophys.* 375: 195-200.
- 78- **Stern DB, Gruissem W. 1989.** Chloroplast mRNA 3' end maturation is biochemically distinct from prokaryotic mRNA processing. *Plant Mol. Biol.* 13: 615-25.

- 79- **Stern DB and Kindle KL. 1993.** 3' end maturation of the *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast *atpB* mRNA is a two-step process. *Mol. Cell Biol.* 13: 2277-85.
- 80- **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.
- 81- **Stüber D, Bannwarth W, Pink JRL; Meloen RH, Matile H. 1990.** New B cell epitopes in the Plasmodium falciparum malaria circumsporozoite protein. *Eur. J. Immunol.* 20: 819-824.
- 82- **Subbaiah CC and Tewari KK. 1993.** Purification and characterization of ribonucleoproteins from pea chloroplast. *Eur. J. Biochem.* 211: 171-179.
- 83- **Takacs BJ and Girard MF. 1991.** Preparation of clinical grade proteins produced by recombinant DNA technologies. *J. Immunol. Methods.* 143: 231-240.
- 84- **Takano E, Maki M, Mori H, Hatanaka M, Marti T, Titani K, Kannagi R, Ooi T, Murachi T. 1988.** Pig Heart Calpastatin: Identification of repetitive domain structures and anomalous behaviour in polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochemistry* 27: 1964-1972.
- 85- **Taylor W. 1989.** Regulatory interactions between nuclear and plastid genomes. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 211-233.
- 86- **Towbin M, Staehelin T, Gordon J. 1979.** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 4350-4354.
- 87- **Toledo G. 1998.** Estudio de la función de la proteína de 24kDa que se une a RNA (24RNP) durante el procesamiento y estabilización de los mRNAs de cloroplasto. -- Tesis de Maestría en C. Bioquímicas. Facultad de Química. UNAM
- 88- **Varani G and Nagai K. 1998.** RNA recognition by RNP proteins during RNA processing. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 27: 407-45.
- 89- **Wienk HJ and Kruijff B. 1999.** Expression, isolation, and characterization of a chloroplast targeting peptide. *Protein Expr. Purif.* 17: 345-350

- 90- **Yang J, Schuster G, Stern DB. 1996.** CSP41, A sequence specific mRNA binding protein is an endoribonuclease. *Plant Cell* 8: 1409-1420.
- 91- **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.* 142: 435-42.
- 92- **Yoo B and Harmon A. 1996.** Intramolecular binding contributes to the activation of CDPK, a protein kinase with a calmoduline-like domain. *Biochemistry* 35: 12029-12037.
- 93- **Zurawski G and Clegg M. 1987.** Evolution of higher plant chloroplast DNA-encoded genes: implication for structure-function and phylogenetic studies. *Annu. Rev. Plant Phys.* 38: 391-402.