



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA DE  
CLOROPLASTO CLB19 (CHLOROPLAST BIOGENESIS  
19) Y LA INTERACCIÓN CON SUS BLANCOS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**B I Ó L O G O**

**P R E S E N T A:**

**ERNESTO LLAMAS PÁMANES**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DRA. PATRICIA LEÓN MEJÍA  
2012**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## Hoja de datos del jurado

### 1. Datos del alumno

Llamas  
Pámanes  
Ernesto  
Universidad Nacional Autónoma de  
México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
408001285

### 7. Datos del trabajo escrito

Análisis de la función de la proteína de  
cloroplasto CLB19 (Chloroplast  
Biogenesis 19) y la interacción con sus  
blancos  
72p  
2012

### 2. Datos del tutor

Dra  
León  
Mejía  
Patricia

### 3. Datos sinodal 1

Dr  
Celis  
Sandoval  
Heliodoro

### 4. Datos sinodal 2

Dra  
Loza  
Tavera  
Herminia de Jesús

### 5. Datos sinodal 3

Dr  
Valdés  
López  
Víctor Manuel

### 6. Datos sinodal 4

Dr  
Jiménez  
García  
Luis Felipe

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Patricia León Mejía por brindarme la oportunidad de realizar mi tesis de Licenciatura en su laboratorio.

Un agradecimiento muy especial a la M. en C. Maricela Ramos Vega quien fue la persona que siguió de cerca este trabajo, me instruyó en las técnicas de laboratorio y me permitió aproximarme a la Biología Molecular. Gracias por todo el tiempo invertido en mi formación.

Al Comité de sinodales: Dr. Heliodoro Celis Sandoval, Dra. Herminia de Jesús Loza Tavera, Dr. Víctor Manuel Váldez López y Dr. Luis Felipe Jiménez García por el tiempo dedicado a la revisión, críticas y contribuciones a esta tesis.

A la Dra. Elizabeth Cordoba Martínez por su ayuda, consejos y aportaciones en la realización de esta tesis.

A la M. en C. Carolina San Román Roque (q.e.p.d.) por su apoyo en aspectos técnicos del laboratorio.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de la Dra. León y el Dr. Rocha, por su ayuda y enseñanzas.

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México; con el apoyo de una beca de alimentación y vivienda (Agosto 2010-Julio 2011).

## **DEDICATORIAS**

A mis padres, Ernesto Llamas Caballero y Patricia Pámanes Rojas y a mis hermanos, Erick y Ricardo. Por todo el apoyo y amor brindado durante mi formación tanto personal y académica. Sin ellos la realización de esta tesis no hubiera sido posible.

A todos mis amigos y maestros con quienes he compartido distintas etapas de mi vida, en especial, a los que estuve durante mi estancia en la Ciudad de México.

## RESUMEN

La transcripción de genes plastídicos, las diferentes modificaciones postranscripcionales, la traducción y el ensamblaje de complejos proteicos median los pasos críticos de la biogénesis y el desarrollo del cloroplasto. En la mayoría de las plantas terrestres los transcritos de los plástidos sufren un procesamiento postranscripcional denominado edición, que consiste en un cambio de una citidina particular a una uridina en diferentes transcritos.

Se ha determinado que la proteína CLB19 participa en la edición de un sólo sitio en dos transcritos cloroplásticos: *rpoA* y *clpP1*. Ambos mensajeros codifican proteínas de función crítica en el desarrollo del cloroplasto. En la mutante *clb19*, la edición de estos dos mensajeros está afectada, por lo que, en este trabajo, se planteó el objetivo de evaluar qué parte del fenotipo, caracterizado previamente, se debe a la falta de edición de *rpoA* o de *clpP1* para esclarecer como afecta la falta de las proteínas RpoA o ClpP1 en el desarrollo del cloroplasto. Para esto, se usaron líneas transgénicas, que codifican para alguno de los transcritos editados, con la finalidad de complementar la mutante *clb19*. Estas líneas transgénicas no fueron capaces de complementar o mejorar el fenotipo de la mutante *clb19*. Posteriormente, se generó una línea doble transgénica, pero tampoco fue capaz de complementar o mejorar el fenotipo mutante. La caracterización molecular de las líneas transgénicas indicó que la actividad de las proteínas, codificadas por los transgenes editados de *rpoA* y *clpP1*, se encuentra afectada, igual que en la mutante *clb19*. Estos resultados indican que las líneas no son funcionales, por alguna razón técnica, por lo que se requieren estrategias más eficaces para separar los fenotipos causados por la no edición de los dos transcritos.

Por otro lado, todos los factores sitio específicos de la edición de RNA, identificados hasta la fecha, son proteínas PPR (pentatricopetide repeat protein) y se ha confirmado que las proteínas PPR se unen a uno o varios blancos de RNA en la región -25/+10 con respecto a la citidina a editar. CLB19 es una proteína PPR que pertenece al grupo E+ de la subfamilia PLS la cual está caracterizada por la presencia de una región

conservada en el carboxilo terminal (domino EE+). Se ha demostrado que el dominio EE+ tiene una función esencial en la edición de RNA pero no la de reconocer secuencias específicas de RNA. Por lo que en este trabajo se expresó y se purificó una proteína recombinante CLB19 truncada de los dominios EE+ que se analizará, en otro trabajo, si ésta es capaz de unirse *in vitro* a sus blancos.

## CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. Desarrollo del cloroplasto .....	1
1.2. La regulación de la expresión genética en cloroplasto .....	3
1.2.1. El genoma plastídico .....	3
1.2.2. La regulación transcripcional.....	4
1.3. Metabolismo del RNA en cloroplasto.....	5
1.3.1. Maduración del RNA .....	6
1.3.2. Estabilidad del RNA .....	6
1.3.3. RNA splicing.....	7
1.4. Edición de RNA.....	7
1.5. Proteínas involucradas en la regulación de la expresión de genes cloroplásticos .....	10
1.6. Algunas proteínas PPR son requeridas para la edición de RNA en cloroplasto .	13
1.6.1. Los motivos E y E+ pueden tener una función común en la edición del RNA .....	15
1.7. La traducción en el cloroplasto .....	18
1.8. Estabilidad y degradación de proteínas en el cloroplasto.....	19
1.8.1. La proteasa Clp .....	20
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	23
2.1. Antecedentes directos .....	29
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	31
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	32
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	33
5.1. Material vegetal.....	33
5.2. Esterilización y estratificación de semillas .....	33
5.3. Crecimiento de <i>A. thaliana</i> en sustrato .....	34
5.4. Cruzas dirigidas .....	34
5.5. Extracción de DNA.....	34
5.6. Análisis por PCR.....	35

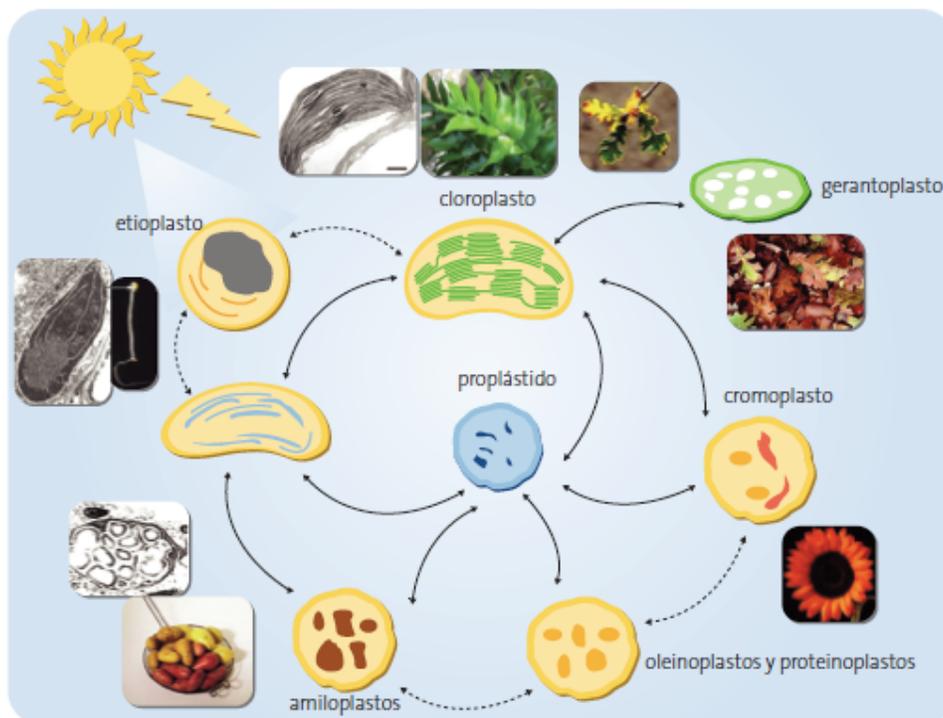
5.6.1. Lista de oligonucleótidos .....	35
5.6.2. Reactivos PCR .....	35
5.6.3. Programa general para las reacciones .....	36
5.7. Electroforesis de DNA en gel de Agarosa .....	36
5.8. Extracción de proteínas .....	36
5.9. SDS PAGE.....	37
5.10. Western blot.....	37
5.11. Extracción de RNA.....	38
5.12. Electroforesis de RNA .....	38
5.13. Northern blot .....	39
5.13.1. Transferencia del RNA en el gel a la membrana de nylon.....	39
5.13.2. Amplificación del gene que se utiliza como sonda radioactiva .....	39
5.13.3. Hibridación de la membrana .....	40
5.14. RT-PCR .....	40
5.14.1. Reverso transcripción.....	40
5.14.2. Condiciones PCR .....	41
5.14.3. Lista de oligonucleótidos .....	41
5.14.4. Programa general para la reacción .....	41
5.15. Clonación del gen CLB19 $\Delta$ EE+ .....	42
5.15.1. Purificación de DNA a partir de gel de agarosa .....	42
5.15.2. Clonación en el vector pENTR D-TOPO .....	42
5.15.3. Movilización de gene del vector de entrada a vector destino.....	42
5.16. Sobreexpresión de la proteína.....	44
5.17. Purificación nativa de la proteína.....	44
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>46</b>
6.1. Las versiones editadas de los genes <i>rpoA</i> y <i>clpP</i> en el fondo <i>clb19</i> , por separado no son capaces de complementar el fenotipo .....	46
6.2. La presencia de ambos transgenes en plantas <i>clb19</i> no complementa el fenotipo de amarillamiento.....	49

6.3. Las plantas amarillas transgénicas para <i>rpoAEd</i> , <i>clpPEd</i> y la doble transgéncia no muestran una diferencia en su morfología y desarrollo en comparación con <i>clb19</i> .....	50
6.4. La actividad de la proteasa Clp no mejora en las líneas portadoras de <i>clpP</i> .....	51
6.5. La actividad de PEP no mejora en las líneas portadoras de la versión editada de <i>rpoA</i> .....	53
6.6. Obtención de la proteína nativa CLB19 sin los dominios E y E+ .....	54
<b>7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES</b> .....	59
<b>8. APÉNDICE</b> .....	70
<b>9. LITERATURA CITADA</b> .....	73

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Desarrollo del cloroplasto

Junto con las vacuolas y la pared celular, los plástidos son componentes característicos de las células vegetales y están involucrados en procesos como la fotosíntesis y el almacenamiento. Los plástidos están comúnmente clasificados por los tipos de pigmentos que contienen (**Figura 1**), por ejemplo los cloroplastos contienen clorofilas y los cromoplastos contienen carotenos acumulan grandes cantidades de pigmentos de rojos a amarillos, responsables de brindar color a flores y frutos de las plantas. Diversos plástidos carentes de pigmentos se agrupan como leucoplastos y dentro de ellos tenemos aquellos que acumulan almidón (amiloplastos), aceites (oleinoplastos) o proteínas (proteinoplastos). Estos plástidos son incoloros y están presentes principalmente en tubérculos y semillas (Raven *et al.*, 2003; León y Guevara-García, 2008).



**Figura 1.** Distintos tipos de plástidos presentes en plantas. Todos los plástidos provienen de los proplástidos, la diferenciación de cada tipo de plástido depende de distintas señales (León y Guevara-García, 2008).

En los cloroplastos maduros los pigmentos como clorofila y carotenos son receptores de la energía lumínica necesaria para la fotosíntesis. En las plantas, los cloroplastos son usualmente en forma de disco y miden entre cuatro y seis micrómetros de diámetro (Raven *et al.*, 2003). Una doble membrana, la interna y la externa, delimitan al cloroplasto. Dentro del cloroplasto existen membranas fotosintéticas extensas también llamadas tilacoides. Estas vesículas se extienden paralelamente al eje cloroplástico principal, formando vesículas planas, algunas apareciendo individualmente (tilacoides estromáticos) o como vesículas organizados en pilas o grana, conteniendo un espacio interno o lumen (López-Juez y Pyke, 2005).

El proceso de diferenciación en cloroplastos involucra la contribución tanto del DNA nuclear como del genoma plastídico; aunque el control general reside claramente en el núcleo. Algunas proteínas cloroplásticas están codificadas en el DNA plastídico y son sintetizadas dentro del cloroplasto la mayoría de las proteínas cloroplásticas están codificadas en el DNA nuclear, son sintetizadas en el citosol y luego importadas al cloroplasto (Raven *et al.*, 2003).

La función de los organelos es esencial para la vida de los eucariontes. Esta función depende de las actividades de proteínas sintetizadas tanto en los organelos como importadas desde el citosol (codificadas en el núcleo). Muchas de estas funciones se llevan a cabo por complejos enzimáticos con subunidades codificadas en ambos compartimientos, por lo tanto la coordinación de la expresión de los genes cloroplásticos tanto nucleares como organelares es de suma importancia (Fujii y Small, 2011).

La biogénesis y desarrollo del cloroplasto en plántulas puede ser descrito como el proceso de diferenciación del plástido progenitor, el proplástido, a un cloroplasto maduro, ya sea directamente o pasando por un intermediario generado en condiciones de oscuridad conocido como etioplasto (Pogson y Albrecht, 2011). El desarrollo del cloroplasto es un proceso complejo y altamente regulado. La transcripción de los genes plastídicos, la diferentes modificaciones postranscripcionales (remoción de intrones,

edición del RNA mensajero (mRNA), etc.), la traducción y el ensamblaje de complejos proteicos median los pasos críticos de la biogénesis del cloroplasto (Waters y Langdale, 2009).

Por lo tanto, la transcripción de genes en el cloroplasto, la maduración del RNA, la traducción y modificación de proteínas tiene un gran impacto en la biogénesis y desarrollo del cloroplasto (Pogson y Albrecht, 2011).

## **1.2. La regulación de la expresión genética en cloroplasto**

### **1.2.1. El genoma plastídico**

Los plástidos al igual que la mitocondria son organelos semiautónomos que llevan a cabo varias funciones regulatorias y metabólicas. El genoma de los plástidos desde las algas verdes hasta las plantas vasculares, es una molécula circular que contiene aproximadamente 120 genes y que codifica diferentes proteínas plastídicas, para tRNAs y para rRNAs. La gran mayoría de los productos de los genes plastídicos son componentes de enzimas fotosintéticas o de la maquinaria basal de expresión de los genes del plástido. Estos incluyen varios de las subunidades de los complejos de la membrana tilacoidal como el fotosistema I (PSI), fotosistema II (PSII), citocromo b6f, ATP sintasa y NADH deshidrogenasa; así como complejos solubles presentes en el estroma como la enzima RUBISCO y para la *accD* (acetil CoA carboxilasa). También están codificados en cloroplasto diferentes genes de mantenimiento (housekeeping), así como varios rRNAs, subunidades de la RNA polimerasa (PEP) y de la proteasa caseinolítica Clp (*clpP1*) (Sakamoto *et al.*, 2008). De esta manera, deben de existir mecanismos para asegurar la acumulación estequiométrica de las proteínas derivadas de dos compartimientos físicamente separados (Barkan y Goldschmidt-Clermont, 2000).

Como las plantas son descendientes de cianobacterias ancestrales, muchos de los genes mantienen características de estos procariontes y están organizados en operones y son co-transcritos. A diferencia de los procariontes los cloroplastos, y

también las mitocondrias, tienen intrones del grupo I y II que probablemente surgieron en el proceso de co-evolución. La producción de las especies maduras de transcritos requiere eventos complejos de procesamiento policistrónico, procesamiento de intrones y remoción de secuencias tanto en el 5'y 3' de los transcritos, lo cual a veces es complejo y lleva a la acumulación de varias moléculas de RNA (Sakamoto, *et al.*, 2008).

La gran mayoría de los genes que se requieren para la función de los cloroplastos están codificados en el núcleo y sus proteínas son importadas al cloroplasto. La mayoría de las proteínas que se dirigen al cloroplasto entran vía el translocón de la membrana externa del cloroplasto (TOC) y el translocón de la membrana interna (TIC). Las proteínas son dirigidas a estos complejos por su péptido de tránsito al cloroplasto por la HSP90 y TOC159. Una vez en el cloroplasto se procesan para remover su péptido señal (Pogson y Albrecht, 2011).

### **1.2.2. La regulación transcripcional**

La transcripción de genes cloroplásticos es catalizada por al menos dos distintas RNA polimerasas. La primera, se parece a la RNA polimerasa de bacterias y consiste en una enzima con varias subunidades codificadas en el plástido, las cuales se ensamblan con factores accesorios codificados en el núcleo (Allison, 2000; Sakamoto *et al.*, 2008). A esta polimerasa se le conoce como PEP (por sus siglas en inglés: plastid-encoded polymerase). La PEP es una holoenzima que consiste de cuatro subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'1$  and  $\beta'2$ ), todas codificadas por genes plastídicos, *rpoA*, *rpoB*, *rpoC1* y *rpoC2*, respectivamente. Polimerasas eubacteriales como la PEP requieren de un factor adicional (sigma), el cual facilita el reconocimiento del promotor. Estos factores no están codificados en cloroplasto. En *Arabidopsis* se han identificado seis factores sigma (SIG1 a SIG6) que se localizan en cloroplastos (Shiina *et al.*, 2005). La PEP es esencial para el desarrollo del cloroplasto y para las funciones fotosintéticas en particular, ya que interrupciones en los genes de la PEP exhiben un fenotipo con deficiencia de pigmentos seguido por una pérdida de membranas tilacoideas apiladas (grana) y la pérdida de proteínas relacionadas con la fotosíntesis (Anamaru *et al.*, 2004).

La segunda polimerasa es codificada totalmente por genes nucleares y está relacionada con ciertas polimerasas de bacteriófagos. Como está codificada en el genoma nuclear se le conoce como NEP (nucleus-encoded polymerase, por sus siglas en inglés) (Sakamoto *et al.*, 2008; Barkan y Goldschmidt-Clermont, 2000). En *Arabidopsis*, tres genes que codifican la NEP han sido identificados: *RpoT3* (o *RpoTp*) para plástidos, *RpoT1* (*RpoTm*) para mitocondria y *RpoT2* (*RpoTnp*) para ambos organelos (Sakamoto *et al.*, 2008). NEP transcribe todos los genes de mantenimiento (housekeeping) y metabólicos de los plástidos (Serino y Maliga, 1998).

Un concepto general aceptado para los papeles diferenciales de las polimerasas durante el desarrollo del cloroplasto es el siguiente: en etapas tempranas, la NEP es altamente expresada. A su vez, esta inducción de la NEP inicia la transcripción de una serie de genes que codifican las subunidades de la PEP (genes *rpo*), RNAs ribosomales, proteínas ribosomales y otras proteínas housekeeping (como *clpP1*). La maquinaria para la síntesis de proteínas y degradación parece ser construida en esta etapa. Mientras el cloroplasto se desarrolla, la PEP ya está activada y se vuelve la polimerasa con mayor actividad en las etapas posteriores de diferenciación. Así la PEP en combinación con varios factores SIG actúa para llevar a cabo la expresión de genes involucrados en la formación de maquinarias fotosintéticas y la formación de membranas tilacoideas (Sakamoto *et al.*, 2008).

### **1.3. Metabolismo del RNA en el cloroplasto**

Los productos de la transcripción de los dos tipos de polimerasas en el cloroplasto son típicamente policistrónicos. La mayoría de los transcritos primarios se someten a procesamientos de maduración de RNA (Barkan y Goldschmidt-Clermont, 2000). Este procesamiento del RNA juega un papel muy importante en la expresión de los genes organelares (Stern *et al.*, 2010) y una amplia gama de proteína de unión a RNA participan y son esenciales en este procesamiento (Fujii y Small, 2011).

El metabolismo del RNA cloroplástico tiene varias características semejantes al de los procariontes, pero la existencia de intrones, la edición de RNA y los complejos patrones de procesamiento de precursores policistrónicos son características totalmente diferentes (Stern *et al.*, 2010). La población de mRNAs maduros en el cloroplasto contiene transcritos primarios y procesados. A continuación se mencionan los distintos tipos de procesamiento del RNA cloroplásticos:

### **1.3.1. Maduración del RNA**

-Maduración del extremo 5'

En muchos casos, el extremo 5' maduro es generado por procesamiento del RNA, más que por la iniciación de la transcripción. Han sido propuestos dos mecanismos que se cree llevan a la formación del extremo 5' y que resulta del procesamiento del RNA: una vía exonucleolítica 5'→3' o una escisión sitio específica por una endoribonucleasa aún no identificada (Stern *et al.*, 2010).

-Maduración del extremo 3'

La mayoría de los extremos 3' son generados por procesamiento, más que por la terminación de la transcripción. Mecanismos exonucleolíticos o endonucleolíticos y proteínas de unión a RNA parecen participar en la formación del 3' (Stern *et al.*, 2010).

### **1.3.2. Estabilidad del RNA**

Una característica no procariontica de los cloroplastos es que la vida media de sus RNAs varían de 30 minutos hasta varios días. Se puede especular que proteínas de unión a RNA que no se encuentran en procariontes regulan el decaimiento en la vida media de los RNAs (Stern *et al.*, 2010).

### **1.3.3. RNA splicing**

Los genomas de los organelos en plantas contienen intrones de dos tipos: grupo I y grupo II. Éstos se definen con base en sus distintos mecanismos de procesamiento y a los elementos estructurales presentes. En cuanto a factores de splicing codificados en el cloroplasto se sabe que algunos intrones de ambos grupos codifican para maturasas que están involucradas en su propio splicing. En cuanto a factores de splicing codificados en el núcleo, existen evidencias de que por lo menos 12 diferentes proteínas están involucradas en el procesamiento de intrones en el cloroplasto. Muchas de estas proteínas, llamadas CRMS (chloroplast RNA splicing and ribosome maturation), pertenecen a una familia que contiene más de 4 dominios de unión a RNA (Stern *et al.*, 2010).

### **1.4. Edición de RNA**

Además de los procesamientos de maduración revisados anteriormente, existe la edición de RNA. Los transcritos de los plástidos pueden estar sujetos a este mecanismo de procesamiento de RNA que cambia la identidad de nucleótidos individuales y así altera la información del contenido del RNA mensajero. Este cambio se le conoce como edición de RNA y es uno de los múltiples eventos de maduración del RNA, que son requeridos antes de que los transcritos de plástidos sirvan como moldes en la biosíntesis de proteínas plastídicas. La edición del RNA en cloroplasto procede por la conversión de un residuo individual de citidina a uridina y, en algunas briofitas, el evento inverso, transiciones de uridina a citidina. Ningún otro tipo de sustitución de nucleótidos ha sido detectada en transcritos plastídicos; sugiriendo que la edición del RNA cloroplástico está restringida a transiciones de pirimidinas (Bock, 2000).

La edición de RNA en general puede ser definida como el proceso que cambia la secuencia del transcrito con respecto a la que está codificada en el DNA. La edición incluye inserciones o deleciones sitio específicas de uno o varios nucleótidos (edición

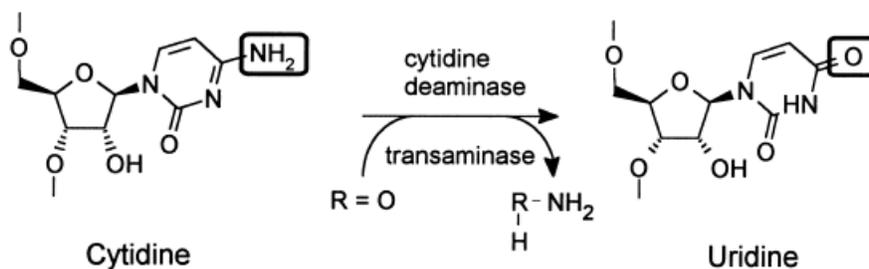
de inserción/delección) y también cambios específicos en la identidad de nucleótidos individuales (edición de conversión) (Bock, 2000).

La edición de RNA fue descubierta en la mitocondria de *Trypanosoma*. Los tripanosomas poseen una gran mitocondria llamada kinetoplasto. Las secuencias de DNA de los genes del kinetoplasto parecían ser pseudogenes ya que a pesar de que exhibían alta similitud con las diferentes subunidades de la cadena respiratoria, no contaban con un marco continuo de lectura. Análisis de la secuencia de los mensajeros correspondientes revelaron que en estos transcritos se habían restaurado los marcos de lectura correctos en todos los casos. Esta reparación a nivel del transcrito ocurre a través de la inserción o delección post-transcripcional de residuos de uridina en sitios altamente específicos (Benne *et al.*, 1986).

Después del descubrimiento de la edición en tripanosomas, se detectaron procesos de edición en mitocondria y plástidos de otros eucariontes. Mientras que la edición en los kinetoplastidos es del tipo inserción/delección, en los plástidos se da una edición del tipo de conversión, es decir la identidad del residuo del nucleótido individual es cambiada pero el tamaño de la molécula de RNA permanece sin cambios (Bock, 2000). La edición en los plástidos fue descubierta en 1991 cuando se secuenció el genoma cloroplástico del maíz. Cuando se alineó el gen *rpl2* con los ortólogos de otras especies, se descubrió que aparentemente este gen en maíz no tenía el codón de iniciación de la traducción. El codón de inicio convencional ATG, el cual está presente en los genes *rpl2* de tabaco y de *Marchantia polymorpha*, estaba reemplazado por un codón ACG en la posición homóloga del maíz y arroz. Sin embargo, la secuencia del cDNA de *rpl2* de maíz reveló que el codón ACG codificado en el genoma había sido reemplazado por el codón correcto de inicio, AUG. Esto sugirió que el codón ACG codificado en el genoma del cloroplasto para *rpl2* sufre una modificación co- o post- transcripcional a través de edición, que lo convierte en un codón de inicio AUG típico (Bock, 2000).

Evidencia obtenida en el sistema de edición en mitocondria de plantas ha indicado que la unión azúcar-fosfato de la cadena del mRNA no es separada durante la reacción de

edición (Rajasekhar y Mulligan, 1993). Igualmente, el enlace N-glicosídico entre la pentosa y la pirimidina parece permanecer intacto (Yu y Schuster, 1995). Estos descubrimientos parecen excluir al mecanismo de escisión de nucleótidos y el de sustitución de base en la edición de RNA en estos organelos. Por lo tanto, el mecanismo más probable involucra una conversión enzimática de citidina a uridina dada por una citidina desaminasa, capaz de actuar en sustratos de poliribonucleótidos o, alternativamente, por una transaminasa (**Figura 2**) (Bock, 2000). Aunque la evidencia bioquímica se obtuvo de mitocondrias de plantas, se cree que un mecanismo similar ocurre en plástidos. Sin embargo, hasta ahora ninguna de las enzimas involucradas en la edición en los organelos de plantas ha sido aislada y caracterizada (Bock, 2000).



**Figura 2.** Probable mecanismo de edición de RNA C-a-U en cloroplasto de plantas superiores. La citidina puede ser convertida en uridina por una desaminación oxidativa en el carbono número seis del anillo de pirimidina. La conversión enzimática de C-a-U puede ser llevada a cabo por una citidina desaminasa o una transaminasa. Una reacción de transaminación requeriría un co-sustrato portando un grupo ceto para aceptar el grupo amino liberado del residuo de citidina. Tomada de Bock, 2000.

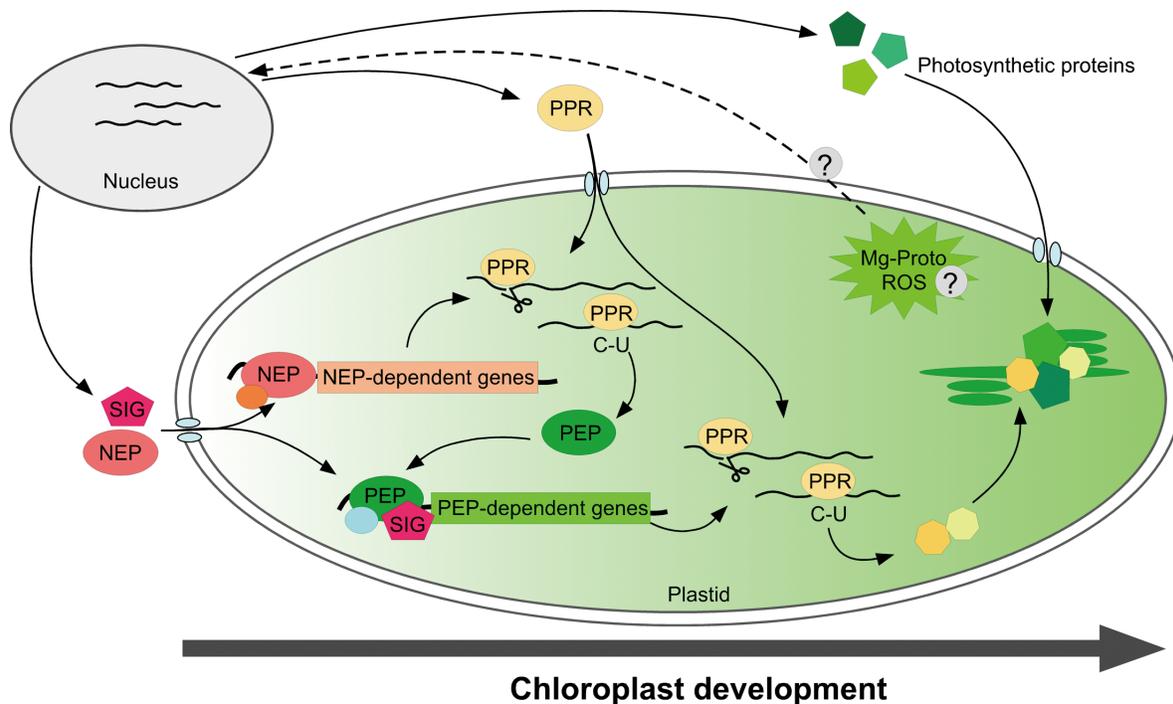
Una pregunta que surge en el proceso de edición es la manera en la cual decenas de sitios son reconocidos específicamente. Experimentos *in vivo* usando cloroplastos transgénicos han mostrado que los sitios de edición son reconocidos por elementos en *cis* que están localizados aproximadamente a unos 30 nucleótidos del sitio de edición. Existe suficiente evidencia bioquímica que sugiere que los factores *trans* que se unen a los elementos *cis* que rodean a los sitios a editar en organelos de plantas, son proteínas (Hammani *et al.*, 2009). La caracterización de mutantes de *Arabidopsis* que muestran defectos en el proceso de edición ha sido de gran ayuda para identificar

algunos genes nucleares que se sospecha codifican factores involucrados en la edición de RNA (Hammani *et al.*, 2009).

### **1.5. Proteínas involucradas en la regulación de la expresión de genes cloroplásticos**

Recientemente se ha demostrado que varias proteínas codificadas en el núcleo que pertenecen a una gran familia conocidas como PPRs (pentatricopetide repeat, por sus siglas en inglés) participan en diversos mecanismos postranscripcionales incluyendo el procesamiento del RNA, splicing, edición, estabilidad, maduración y traducción de los mensajeros en organelos (**Figura 3**). Ésta es una de la familia de proteínas más grande del genoma de plantas con más de 450 miembros en *Arabidopsis thaliana* y 560 en arroz. En varios casos los fenotipos de las mutaciones en alguna de las proteínas PPR son letales lo que demuestra que típicamente cada proteína PPR tiene una función específica no redundante (Pogson y Albrecht, 2011).

Aunque las proteínas PPR han sido reportadas en todos los eucariontes, la cantidad de estas proteínas es mucho mayor en plantas comparado con otros eucariontes. Por ejemplo, *Drosophila* y *Caenorhabditis elegans* tienen sólo dos proteínas PPR (Saha *et al.*, 2007).



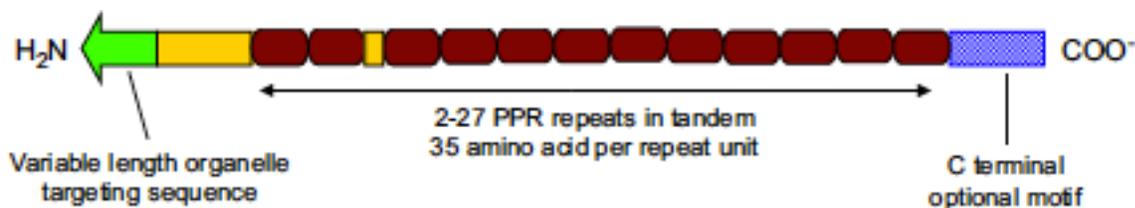
**Figura 3.** Esquema que representa la expresión genética y el ensamblaje de proteínas fotosintéticas. Este proceso está dictado por la coordinación de la transcripción mediada por las polimerasas NEP y PEP y por pasos regulatorios postranscripcionales mediados por las proteínas PPR. Tomado de Sakamoto *et al.*, 2008.

La familia PPR está caracterizada por tener el motivo distintivo degenerado de repeticiones de 35 aminoácidos generalmente arreglado en tándem de 2 a 27 repeticiones por péptido (Luri *et al.*, 2004; Small y Peeters, 2000). Basados en análisis bioinformáticos, la mayoría de las proteínas PPR se pronostica que se dirigen a mitocondria o a cloroplasto (Lurin *et al.*, 2004).

La función más probable de la mayoría de las proteínas PPR es que son proteínas de unión a RNA involucradas en modular la expresión de los genes de los organelos procesando y/o estabilizando diferentes transcritos, así como regulando su traducción (Saha *et al.*, 2007). Por lo tanto los genes PPR en plantas juegan un papel esencial en la embriogénesis vegetal y otros procesos del desarrollo de la planta (Saha *et al.*, 2007). En los casos analizados cada miembro de la familia de las PPR se une a un RNA

específico y al parecer recluta factores generales para su procesamiento, maduración y traducción, regulando de esta manera su expresión (Saha *et al.*, 2007).

La estructura típica de una proteína PPR contiene en el amino terminal una secuencia de tránsito a organelos de tamaño variable y de 2 a 27 repeticiones PPR arregladas en tándem (**Figura 4**). Estructuralmente, los motivos PPR se parecen a otro motivo de repeticiones llamado tetratricopéptido (TPR) que se encuentra en diferentes proteínas eucarióticas y que están implicadas en mediar interacciones proteína-proteína. (Saha *et al.*, 2007). Las proteínas TPR consisten en un par de hélices antiparalelas (Das *et al.*, 1998). Las repeticiones TPR organizadas en tándem forman un surco central que se cree sirve como sitio de unión de otra proteína. Basados en esta conformación de las TPR se predice que las repeticiones PPR forman también hélices que sirven como sitio de unión para una molécula de cadena sencilla de RNA (Saha *et al.*, 2007).



**Figura 4.** Un arreglo típico estructural de una proteína con repeticiones de pentatricopéptidos. Tomado de Saha *et al.*, 2007.

Las repeticiones PPR clásicas (designadas como motivos P) están arregladas en tándem, pero en algunos casos pueden presentar gaps regularmente de no más de 70 aminoácidos. Alineamientos bioinformáticos de las secuencias entre PPRs de plantas mostraron dos tipos de PPRs, unas cuyas secuencias repetidas contienen sólo 31 aminoácidos y otras en que el motivo PPR es un poco más largo, de 35-36 aminoácidos. Estos motivos fueron designados como PPR-S (por cortos “short”) y PPR-L (por largos “long”) (Lurin *et al.*, 2004). Así, con base en la longitud y arreglo de las repeticiones de motivos, las proteínas PPR están agrupadas en dos subfamilias, las

proteínas PPR clásicas que contienen sólo motivos P y las proteínas combinatorias y modulares de plantas (por sus siglas en inglés: PCMPs) con bloques repetidos de motivos P-L-S, estas últimas sólo se encuentran en plantas (Aubourg *et al.*, 2000; Rivals *et al.*, 2006).

El carboxilo terminal de las proteínas PPR es variable y algunas de ellas contienen motivos no relacionados con los dominios PPR conocidos como E o E+ (de extendidos) o DYW. Estos tres motivos están presentes en proteínas de la subfamilia PCMPs y no en ninguna otra proteína de *Arabidopsis* (Lurin *et al.*, 2004). Los motivos E y E+ no tienen una secuencia conservada, mientras que el motivo DYW tiene una alta similitud en secuencia de aminoácidos, particularmente en residuos de Cys e His (Aubourg *et al.*, 2000). Los tres motivos del carboxilo terminal siempre aparecen continuos y con un orden conservado de E, E+ y DYW. La presencia de estos motivos en el carboxilo terminal de proteínas PPR no es una regla, no se encuentra en las proteínas PPR conocidas como “clásicas” y está usualmente asociado con proteínas de la subfamilia PCMPs. Estos motivos ha sido implicados en el reclutamiento de factores catalíticos para el procesamiento del RNA (Rivals *et al.*, 2006).

Como se mencionó anteriormente por análisis computacionales se predice que la mayoría de las proteínas PPR tienen una secuencia de tránsito a organelo, ya sea a mitocondria o cloroplasto (Small y Peeters, 2000; Lurin *et al.*, 2004). Experimentalmente dicha localización subcelular se determina visualizando en la célula la expresión de un gen reportero, como la proteína verde fluorescente (GFP) u otro marcador visual, cuando éste es fusionado en fase con la proteína PPR de interés o con una parte de ella y es introducido en células vegetales (Saha *et al.*, 2007).

#### **1.6. Algunas proteínas PPR son requeridas para la edición de RNA en cloroplasto**

La proteína CRR4 fue una de las primeras PPRs en identificarse como un factor requerido para la edición de RNA en cloroplasto (Kotera *et al.*, 2005) posteriormente

muchas proteínas PPR han sido identificadas como factores requeridos para la edición. Estas proteínas PPR se agrupan dentro de la clase PLS, una posible excepción es la proteína de *Arabidopsis* PPR596 quien pertenece a la clase P y que suprime la edición de RNA en los transcritos mitocondriales del gen *rps3* (Doniwa *et al.*, 2010).

Se ha especulado que la mayoría de los miembros de la clase PLS podrían estar involucrados en la edición de RNA (**Tabla 1**). Pero también existen otras proteínas de esta clase que no están involucradas en la edición como: la proteína CRR2 que pertenece a la clase DYW y que está involucrada en la escisión del RNA de un transcrito cloroplástico (Okuda *et al.*, 2009) y la proteína OTP70 de la subclase E, la cual está involucrada en el splicing de los transcritos cloroplásticos del gen *rpoC1* (Chateigner-Boutin *et al.*, 2011).

**Tabla 1.** Factores de edición conocidos de organelos de plantas. Tomada de Fujii y Small, 2011.

Organelle	AGI	Subclass	Name	Edited gene	Reference
Chloroplast	At1g08070	DYW	OTP82	<i>ndhG, ndhB</i>	Hammani <i>et al.</i> (2009)
Chloroplast	At1g11290	DYW	CRR22	<i>ndhB, ndhD, rpoB</i>	Okuda <i>et al.</i> (2009)
Chloroplast	At1g15510	DYW	AtECB2/VAC1	<i>accD</i>	Yu <i>et al.</i> (2009), Tseng <i>et al.</i> (2010)
Chloroplast	At1g59720	DYW	CRR28	<i>ndhB, ndhD</i>	Okuda <i>et al.</i> (2009)
Chloroplast	At2g02980	DYW	OTP85	<i>ndhD</i>	Hammani <i>et al.</i> (2009)
Chloroplast	At2g29760	DYW	OTP81	<i>rps12 intron</i>	Hammani <i>et al.</i> (2009)
Chloroplast	At3g22690	DYW	YS1	<i>rpoB</i>	Zhou <i>et al.</i> (2008)
Chloroplast	At3g57430	DYW	OTP84	<i>ndhF, psbZ, ndhB</i>	Hammani <i>et al.</i> (2009)
Chloroplast	At3g63370	DYW	OTP86	<i>rps14</i>	Hammani <i>et al.</i> (2009)
Chloroplast	At5g13270	DYW	RARE1	<i>accD</i>	Robbins <i>et al.</i> (2009)
Chloroplast	At5g48910	DYW	LPA66	<i>psbF</i>	Cai <i>et al.</i> (2009)
Chloroplast	At2g45350	E	CRR4	<i>ndhD</i>	Kotera <i>et al.</i> (2005)
Chloroplast	At5g59200	E	OTP80	<i>rpl23</i>	Hammani <i>et al.</i> (2009)
Chloroplast	At1g05750	E	CLB19	<i>rpoA, clpP</i>	Chateigner-Boutin <i>et al.</i> (2008)
Chloroplast	At5g55740	E	CRR21	<i>ndhD</i>	Okuda <i>et al.</i> (2007)
Mitochondria	At2g03880	DYW	REME1	<i>nad2, orfX</i>	Bentolila <i>et al.</i> (2010)
Mitochondria	At2g25580	DYW	MEF8	<i>nad5</i>	Takenaka <i>et al.</i> (2010)
Mitochondria	At3g12770	DYW	MEF22	<i>nad3</i>	Takenaka <i>et al.</i> (2010)
Mitochondria	At4g14850	DYW	LOI1/MEF11	<i>cox3, nad4, ccb203</i>	Tang <i>et al.</i> (2010), Verbitskiy <i>et al.</i> (2010)
Mitochondria	At5g52630	DYW	MEF1	<i>rps4, nad7, nad2</i>	Zehrmann <i>et al.</i> (2009)
Mitochondria	<i>Oryza sativa</i>	DYW	OGR1	<i>cox2, cox3, ccmC, nad2, nad4</i>	Kim <i>et al.</i> (2009)
Mitochondria	<i>Physcomitrella patens</i>	DYW	PpPPR_56	<i>nad3, nad4</i>	Ohtani <i>et al.</i> (2010)
Mitochondria	<i>Physcomitrella patens</i>	DYW	PpPPR_71	<i>ccmF</i>	Tasaki <i>et al.</i> (2010)
Mitochondria	<i>Physcomitrella patens</i>	DYW	PpPPR_77	<i>cox2, cox3</i>	Ohtani <i>et al.</i> (2010)
Mitochondria	<i>Physcomitrella patens</i>	DYW	PpPPR_91	<i>nad5</i>	Ohtani <i>et al.</i> (2010)
Mitochondria	At1g62260	E	MEF9	<i>nad7</i>	Takenaka (2010)
Mitochondria	At2g22410	E	SLO1	<i>nad4, nad9</i>	Sung <i>et al.</i> (2010)
Mitochondria	At3g05240	E	MEF19	<i>ccb206</i>	Takenaka <i>et al.</i> (2010)
Mitochondria	At3g18970	E	MEF20	<i>rps4</i>	Takenaka <i>et al.</i> (2010)
Mitochondria	At5g19020	E	MEF18	<i>nad4</i>	Takenaka <i>et al.</i> (2010)
Mitochondria	At2g20540	E	MEF21	<i>cox3</i>	Takenaka <i>et al.</i> (2010)

Sólo pocas proteínas PPR se ha encontrado que pueden unirse a múltiples sitios blanco, entre las más estudiadas se encuentran las proteínas de maíz (*Zea mays*) CRP1 y la proteína PPR10 (Hammani *et al.*, 2009). En estos dos casos sus sitios de edición tienen una secuencia casi idéntica. Vale la pena señalar que hasta el momento no se ha encontrado alguna característica en cuanto al tamaño, número de motivos o algún otra característica en la secuencia o estructura de la proteína que pueda distinguir entre las proteínas PPR que reconocen múltiples sitios blanco, de aquellas que sólo reconocen uno (**Figura 5**) (Hammani *et al.*, 2009).

#### **1.6.1. Los motivos E y E+ pueden tener una función común en la edición del RNA**

La mutante *crr4* de *Arabidopsis* es defectuosa en la edición del RNA del gen *ndhD-1* del cloroplasto (Kotera *et al.*, 2005) El gen *ndhD* codifica una subunidad del complejo cloroplástico NAD(P)H deshidrogenasa, el cual está involucrado en el flujo cíclico de electrones en el fotosistema I (Okuda *et al.*, 2006). La proteína CRR4 contiene 11 motivos PPR, un motivo E y un motivo desconocido. El trabajo de Okuda y colaboradores (2006) mostró que CRR4 interacciona directamente con el RNA de *ndhD-1*. CRR4 se une específicamente a los 25 nucleótidos corriente arriba y los 10 nucleótidos corriente abajo del sitio de edición. Usando RNA pre-editado y post-editado del transcrito mostró que la afinidad de unión de CRR4 al RNA pre-editado es ligeramente menor. Sugiriendo que la citidina en el sitio de edición no es una característica crítica para el factor activador en *trans* (Okuda *et al.*, 2006). Estos datos sugieren que esta proteína PPR actúa como un factor en *trans* para la edición de RNA plastídico.



Posteriormente se descubrió otra proteína PPR denominada CRR21 que pertenece a la clase E+ de la subfamilia PLS. Sin embargo, CRR21 y CRR4 no muestran una similitud significativa en los motivos de PPR. Esto podría deberse a que distintos arreglos en tándem de los motivos PPR son capaces de reconocer distintas secuencias específicas de RNA. Los motivos E y E+ de estas proteínas se localizan hacia el carboxilo terminal y están altamente conservados en secuencia entre CRR4 y CRR21. Aunque CRR4 y CRR21 reconocen distintos blancos de RNA su similitud en los dominios E sugiere una función común en ambas proteínas y no una función específica de reconocer distintas secuencias de RNA. Cuando se intercambi6 el dominio E/E+ de CRR4 con el de CRR21 el gen quimérico fue capaz de restaurar la edición de *ndhD-1* en el fondo mutante, aunque a niveles ligeramente menor que en una planta wt. En un experimento recíproco también se restaur6 la edición de *ndhD-2*. Esto confirma que los dominios E/E+ de las proteínas CRR4 y CRR21 tiene una función o mecanismo de acción similar en la edición de RNA (Okuda *et al.*, 2007).

Además en el trabajo de Okuda *et al.*, 2007 se realizó un ensayo electroforético de retraso (EMSA) usando un proteína recombinante CRR4 troncada del dominio E/E+ y una sonda de RNA conteniendo la secuencia de reconocimiento de CRR4. En este ensayo se observ6 una banda retardada cuando se increment6 la concentración de la proteína recombinante con una Kd de 1.8 nM un valor muy similar a la afinidad de unión de la proteína completa CRR4 (**Figura 6**). Estos resultados indicaron que el dominio E/E+ no es importante para la unión de alta afinidad al RNA.



componentes de los complejos proteicos cloroplásticos que están compuestos por subunidades de origen tanto nuclear como plastídico (Danon, 1997).

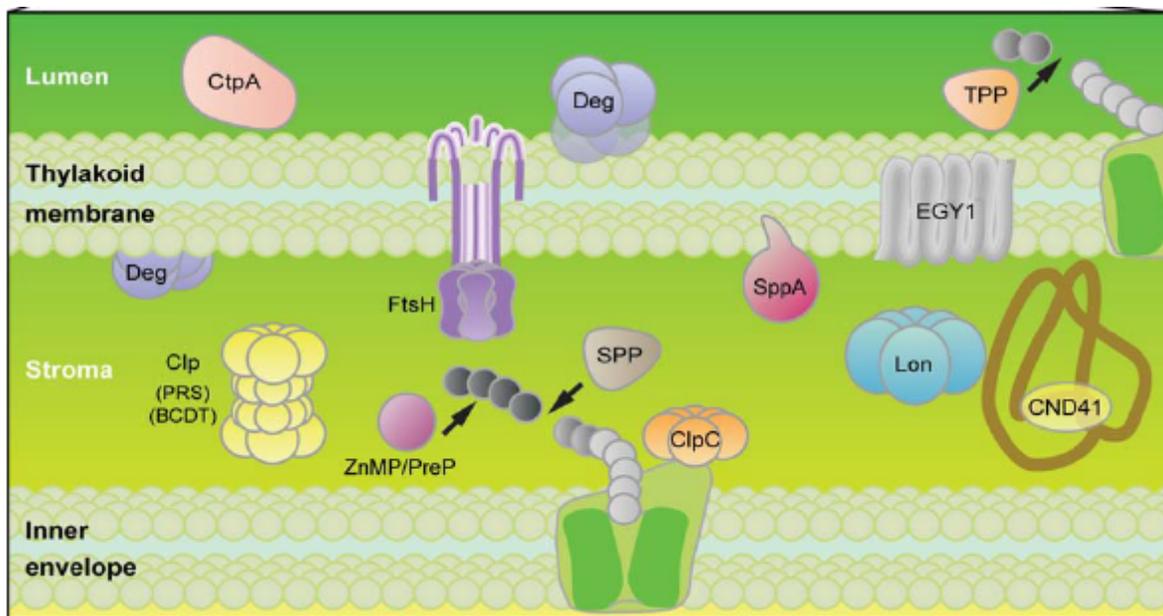
### **1.8. Estabilidad y degradación de proteínas en cloroplasto**

Existen evidencias que indican que las proteasas tienen un papel muy importante en la transición de un tipo de plástido a otro. Además se sabe que el aparato fotosintético en cloroplasto se encuentra sometido a un constante daño fotooxidativo por lo que algunas proteínas deben ser continuamente removidas por proteasas (Sakamoto, 2006). Por lo tanto la degradación de proteínas cloroplásticas es mantenida por un estricto control de calidad, que puede ser considerado como el ajuste final en el último paso de la expresión genética (Sakamoto *et al.*, 2008).

En el citoplasma, generalmente se acepta que la degradación dependiente de ubiquitina a través del proteosoma 26S es una vía importante regulatoria. Sin embargo, en cloroplastos, esta vía no se encuentra y diversos estudios han revelado que los cloroplastos tienen muchas proteasas tipo procarióticas algunas de las cuales son dependientes de ATP y están relacionadas evolutivamente con el proteosoma 26S (Adam *et al.*, 2006). De las 3,000 a 3,500 proteínas que constituyen los cloroplastos, incluyendo las que están codificadas en cloroplasto, el 5 % se cree que están funcionalmente relacionadas con la degradación de proteínas tal y como se muestra en la **figura 7**. Existen al menos once tipos diferentes de familias de proteasas y peptidasas codificadas por más de 50 genes. Los diferentes tipos de proteasas incluyen las serina-metaloproteasas y posiblemente cisteína y aspártico proteasas y varias de ellas requieren ATP (Sakamoto *et al.*, 2008). Las proteasas o peptidasas en los plástidos tienen dos tipos de funciones. La primera función es su actividad endopeptídica, que se encarga de remover el péptido de tránsito en el estroma de las proteínas importadas a estos organelos y de eventos procesivos (degradación gradual de oligopéptidos a aminoácidos) para el ensamblaje correcto del fotosistema II. La segunda función de las proteasas plastídicas es la degradación procesiva o gradual de proteínas. Este tipo de degradación se requiere para remover proteínas innecesarias

que están generadas en exceso, por errores de ensamblaje, daño por calor o fotooxidativo (Sakamoto, 2006).

Uno de los tipos de proteasas mejor caracterizados son las proteasas dependientes de ATP que incluyen a las proteasas Clp, FtsH y Lon y que son consideradas las enzimas que están mayormente involucradas en la degradación procesiva. La estructura básica de las proteasas dependientes de ATP en plantas es muy similar a la arquitectura de proteasas bacterianas, pero estas enzimas plastídicas tienen un número extraordinario de isómeros (Sakamoto, 2006).

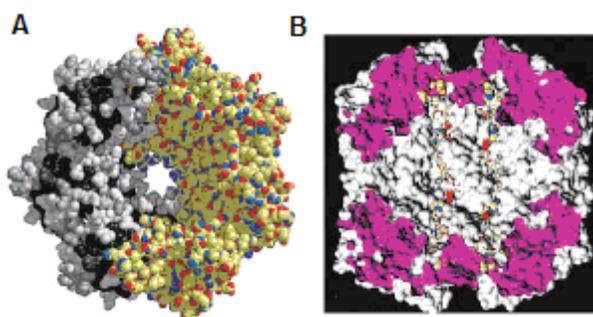


**Figura 7.** Esquema de los tipos y funciones de las proteasas en plástidos. Una vez que los cloroplastos están formados, el control de calidad de las proteínas es llevado a cabo principalmente por las proteasas dependientes de ATP y son cruciales para el mantenimiento. La degradación procesiva es requerida para la transición entre los distintos tipos de plástidos. Tomado de Sakamoto, 2006.

### 1.8.1. La proteasa Clp

Clp es una serina-proteasa dependiente de ATP cuyo modo de acción ha sido caracterizado en *E. coli*. Clp consiste en un núcleo catalítico flanqueado en uno o ambos lados por una chaperona HSP100. El núcleo proteolítico tiene forma de barril y

consiste en dos anillos heptaméricos formados por la subunidad ClpP1, cuyo sitio catalítico está situado dentro de la cavidad central como se muestra en la **figura 8** (Wang *et al.*, 1997). Adyacente a la entrada del núcleo proteolítico está un solo anillo homogéneo hexamérico de ClpA o ClpX, dos miembros de la familia HSP100 de chaperonas. Estos componentes confieren especificidad de sustrato a la proteasa y desnaturalizan a la proteína sustrato de una manera dependiente de energía. Una vez que los sustratos son desnaturalizados éstos son transferidos al núcleo proteolítico y rápidamente degradados a pequeños fragmentos peptídicos (Sjögren *et al.*, 2006).



**Figura 8.** Representación tridimensional del heptámero ClpP en *E. coli*. A. Vista a la cavidad central del heptaedro. D. Sección longitudinal del tetradecámero.

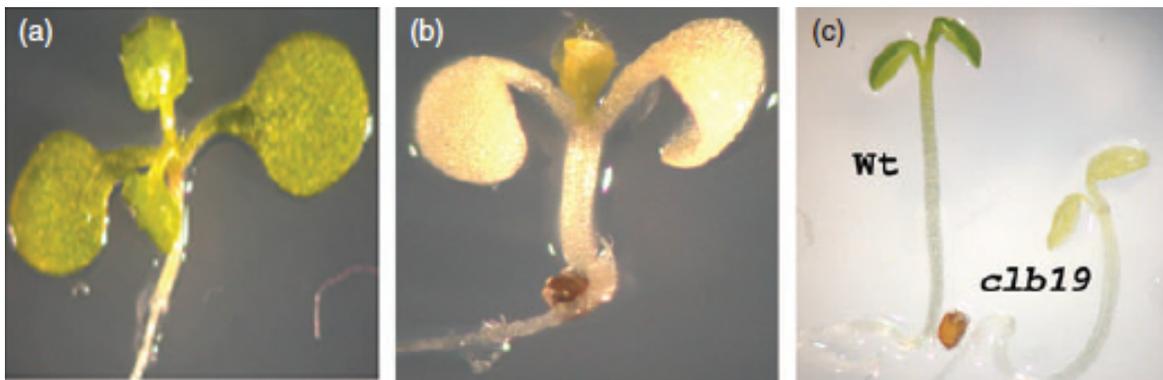
En contraste con *E. coli*, la Clp de *Arabidopsis thaliana* consta de al menos 23 proteínas individuales Clp (Peltier *et al.*, 2004; Adam *et al.*, 2001), de las cuales 10 son chaperonas tipo HSP100 (ClpB1-4, ClpC1-2, ClpD y ClpX1-3), seis son parálogas a la subunidad proteolítica ClpP (ClpP1-6) y cuatro son parálogas a la subunidad ClpP-like (ClpR), la que aparentemente no forma parte de la tríada catalítica (ClpR1-4). Adicionalmente a las anteriores, *Arabidopsis* posee dos proteínas Clp únicas, con similitud de secuencia en el amino terminal a las HSP100. Estas proteínas fueron designadas ClpS1 y ClpS2 (Peltier *et al.*, 2004). La mayoría de las proteínas Clp en *Arabidopsis* están localizadas en el estroma del cloroplasto y todas están codificadas en el núcleo, excepto ClpP1. La mayor parte de las proteínas cloroplásticas ClpP se asocian a un complejo núcleo proteolítico de 325 a 350 kDa el cual está conformado por ClpP1, ClpP3-6 y por los parálogos ClpR1-4 junto con las dos proteínas ClpS1-2

(Peltier *et al.*, 2004). Este complejo núcleo (ClpP/R/S) se forma como un doble anillo heptamérico análogo al núcleo proteolítico de *E. coli*, (**Figura 8**) (Sjögren *et al.*, 2006).

Las tasas de traducción y degradación de proteínas son importantes para el desarrollo del cloroplasto. El complejo con multisubunidades ClpP/R/S tiene un rol central en degradar proteínas y es requerido para la homeostasis de proteínas cloroplásticas. Las pérdidas de las proteínas ClpP pueden llegar a ser embrión-plántula letales (Pogson y Albrecht, 2011). En plantas todas las subunidades parecen ser esenciales para la viabilidad, sugiriendo un papel único para cada una de ellas. Un estudio con una línea knockdown de ClpP6 reveló posibles sustratos de ClpP, apoyando que esta proteasa juega un rol en el control de calidad de las proteínas de mantenimiento (“housekeeping”) del organelo, más que de proteínas fotosintéticas o de otras funciones metabólicas (Sjögren *et al.*, 2006).

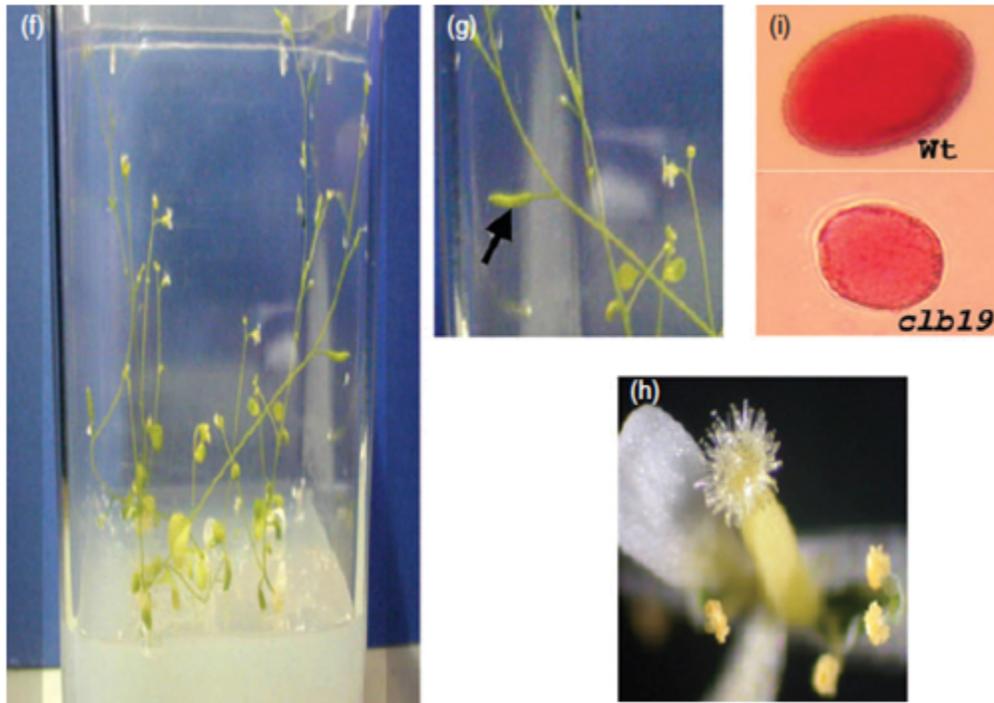
## 2. ANTECEDENTES

En una búsqueda de mutantes afectadas en la biogénesis del cloroplasto, en el grupo de investigación se identificó a la mutante *clb19-1*, que se caracteriza por desarrollar cotiledones y hojas amarillo pálido cuando crece a condiciones estándar de luz y mueren en un tiempo corto (**Figura 9**). En condiciones en las que *clb19-1* puede continuar su desarrollo, como en medio complementado con sacarosa como fuente de carbono, la planta presenta niveles bajos de pigmentos, produce numerosas hojas, tallos con inflorescencia, flores, silicuas, polen viable e incluso semillas viables (**Figura 10**). Aunque su desarrollo se da más lento en comparación con plantas de tipo silvestre (wt) (Chateigner-Boutin *et al.*, 2008).



**Figura 9.** (a) Morfología de planta silvestre (wt) de 15 días (b) morfología de la planta *clb19* de 15 días (c) comparación de wt con *clb19*. Tomada de Chateigner-Boutin *et al.*, 2008.

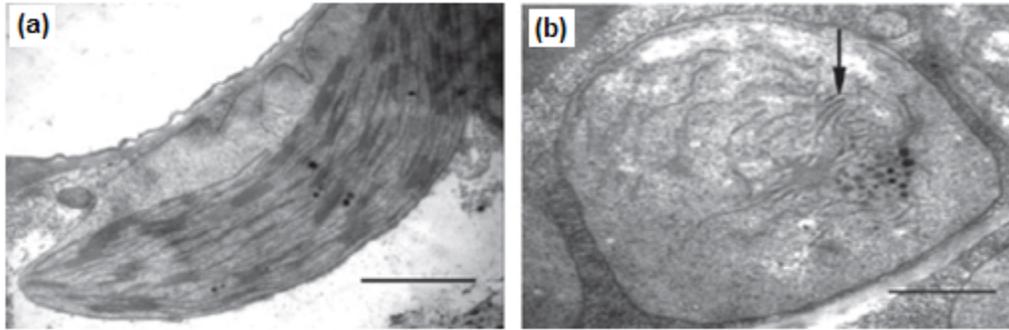
Los plástidos de las hojas de *clb19-1* tienen una forma irregular y son más pequeños comparados con los cloroplastos de plantas silvestres (**Figura 11**). El desarrollo del organelo está arrestado en una etapa temprana de la biogénesis del cloroplasto (Vothknecht y Westhoff, 2001). Contiene pocas membranas internas en forma de tilacoides alargados pero no hay apilamiento.



**Figura 10.** (f-h) Morfología de una planta *clb19* de 60 días cultivada en medio de germinación, mostrando hojas verde pálido (f) silicuas (g) y flores (h). Granos de polen teñidos con acetocarmine (i) . La flecha en (g) indica la silicua. Tomada de Chateigner-Boutin *et al.*, 2008.

Esta mutante se aisló de una colección generada por inserciones de T-DNA (Gutiérrez-Nava *et al.*, 2004) y el fenotipo mutante segrega como un gen único recesivo en proporción 1:3. La identificación de la inserción en el genoma de esta planta mostró que ésta afectaba al gen At1g05750 al cual se le denominó *CLB19*. También fue corroborado que el fenotipo amarillo de la mutante era revertido por la expresión del gen *CLB19* silvestre y que su producto protéico se localiza en los cloroplastos (Chateigner-Boutin *et al.*, 2008).

La secuencia del gen *CLB19* contiene 10 motivos PPR o tipo PPR (P, L, L2 o S) en tándem (Lurin *et al.*, 2004). Estos motivos están presentes en un arreglo triple (P-L-S) (**Figura 12**). Además de los motivos PPR, el carboxi terminal de *CLB19* contiene dos motivos extras, E y E+; por lo que esta proteína pertenece a la subclase E/E+ según la clasificación de Lurin *et al.* (2004).

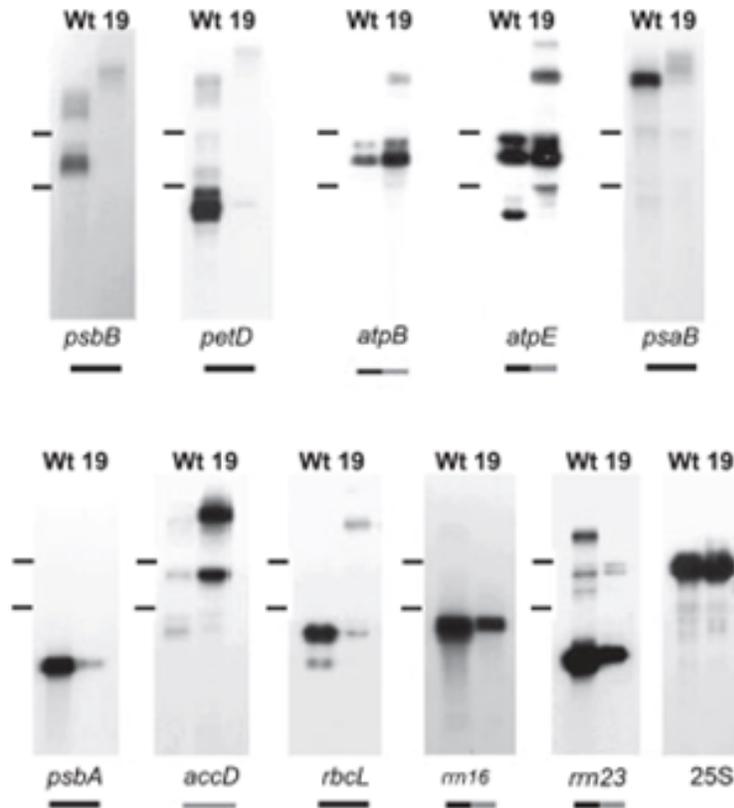


**Figura 11.** Micrografías de transmisión electrónica de plástidos de hojas de 15 días de plantas silvestres (a) y de *clb19* (b). Barra de escala 1 µm. La flecha muestra estructuras membranales observadas en la planta mutante. Tomado de Chateigner-Boutin *et al.*, 2008.

El análisis de los perfiles de expresión de genes cloroplásticos entre *clb19* y plantas silvestres mostró que tanto el nivel como el patrón de expresión de varios transcritos están afectadas en la mutante *clb19*. En general se observaron tres tipos de defectos que incluyen: en genes como *psbA* y *rrn16* se observó una disminución notable en los niveles de sus transcritos maduros pero con un patrón indistinguible del de la planta silvestre. En contraste para los genes como *psbB*, *petD*, *psaB*, *rrn23* y *rbcL* además de presentar niveles muy bajos del transcrito maduro se observó la acumulación de especies de mayor peso molecular no presentes en plantas silvestres y que corresponden probablemente a especies no maduras. Finalmente para genes como *atpB*, *atpE* y *accD* se observó una mayor acumulación de sus transcritos comparados con la planta silvestre (**Figura 13**). Estos cambios en los perfiles de transcripción se reflejan también en bajos niveles de acumulación de diversas proteínas cloroplásticas como RbcL y componentes de los fotosistemas (Chateigner-Boutin *et al.*, 2008).



**Figura 12.** Representación esquemática de los motivos PPR en la proteína CLB19. cTP indica el péptido de tránsito al plástido. Tomado de Chateigner-Boutin *et al.*, 2008.



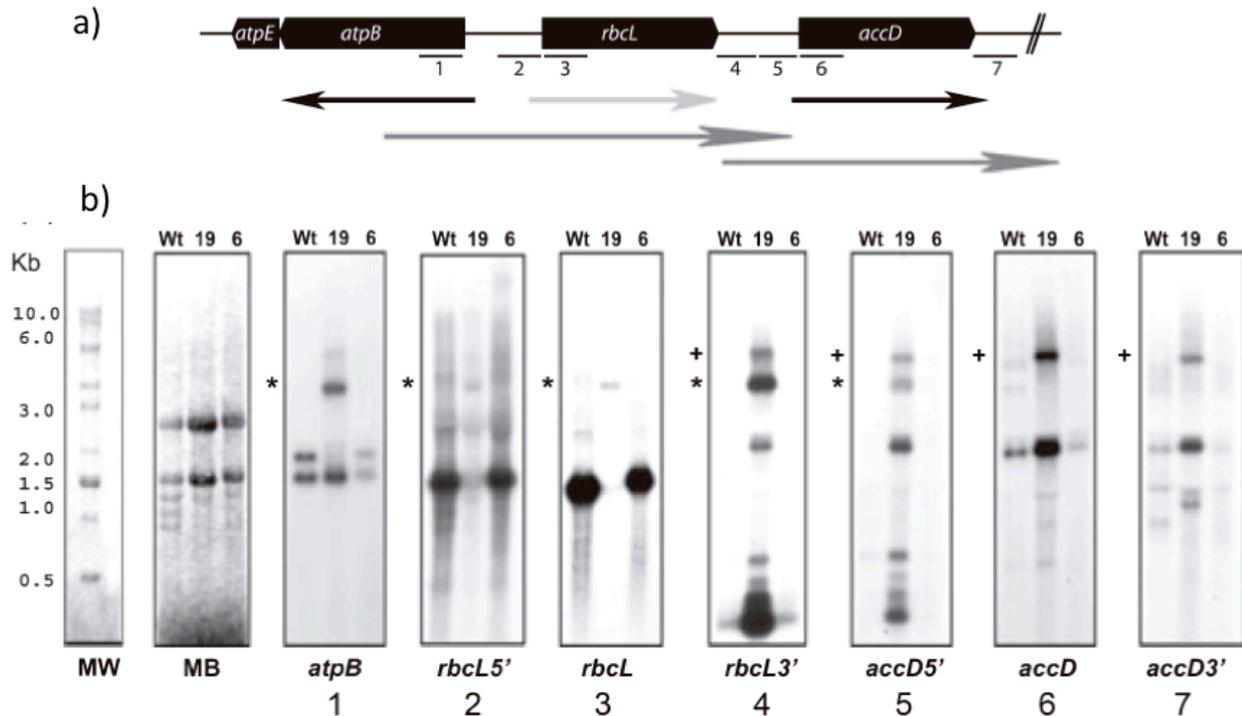
**Figura 13.** Análisis de la expresión de genes cloroplásticos en la mutante *clb19* y plantas wt. Las barras negras abajo del gel indican que el gene es transcrito por la PEP, las barras grises indican que el gen es transcrito por la NEP y las barras negro/gris indican transcripción por PEP y NEP. Como control de carga se muestra el rRNA 25S codificado en el núcleo. Tomado de Chateigner-Boutin *et al.*, 2008.

El análisis de los patrones de expresión de los genes descritos anteriormente mostró que todos los transcritos que se acumulan en niveles mayores en *clb19* son transcritos por la polimerasa NEP, mientras que los que muestran niveles menores y tienen defectos de procesamiento se transcriben por la PEP o por ambas polimerasas (Chateigner-Boutinn *et al.*, 2008).

Un análisis más detallado de los transcritos de algunos genes como *rbcL* y *accD* a través del uso de sondas secuenciales que abarcan tanto la región codificante como las regiones 5' y 3' no codificantes mostraron de forma más precisa las alteraciones de sus transcritos. En el caso del gen *rbcL* el transcrito maduro de 1.8 kb que se acumula en

las plantas silvestre es prácticamente indetectable en *clb19*. Sin embargo, en esta mutante se detecta un transcrito de aproximadamente 4 kb a niveles bajos. Por lo tanto los defectos de transcripción observados en *clb19* son consistentes con alteraciones en la actividad de polimerasa. Adicionalmente, los defectos en el procesamiento no son consecuencia del arresto del cloroplasto en general, ya que estos defectos no se observan en la mutante albina no relacionada *clb6* (**figura 14**) (Chateigner-Boutin *et al.*, 2008).

Todos los defectos mencionados de la mutante *clb19* pudieron ser explicados al analizar los sitios de edición en esta mutante ya que presentó dos sitios no editados en los transcritos de *rpoA* y *clpP*. En plantas silvestres la edición del codón 67 en el transcrito *rpoA*, que codifica la subunidad alfa de la PEP polimerasa, resulta en el cambio de una serina por una fenilalanina. Esta modificación portranscripcional no se detecta en los alelos mutantes de *clb19*. Similarmente, la edición del codón 187 en el transcrito para el gen *clpP1*, el cual codifica la subunidad catalítica de la serina proteasa CIP dependiente de ATP, cambia una histidina a una tirosina en plantas silvestres. Este cambio tampoco es detectado en la mutante *clb19*. La edición de ambos sitios se restaura en plantas mutantes complementadas con el gen silvestre *CLB19*. Ambos eventos de edición resultan en el cambio de codones para aminoácidos que están altamente conservados en ambos genes en otros organismos, lo que sugiere que estos aminoácidos probablemente son importantes para la función de las proteínas RpoA y ClpP1 (Chateigner-Boutin *et al.*, 2008).



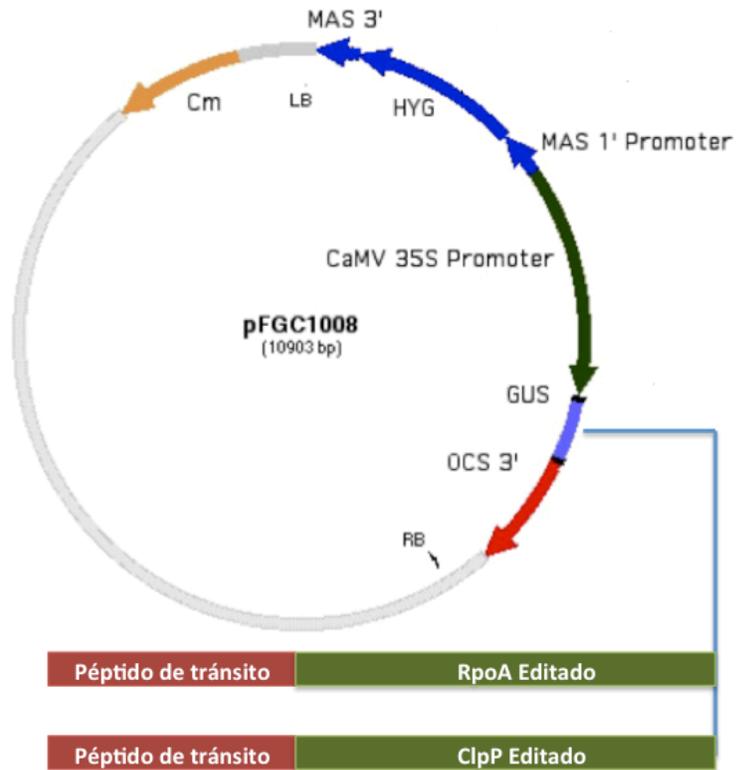
**Figura 14.** Análisis de expresión de regiones de *atpB*, *rbcL* y *accD* en la mutante *clb19*. a) representación esquemática de sondas usadas (1-7) en la figura b. Las flechas negras indican los transcritos *atpB* y *accD* presentes en wt y *clb19*. La flecha gris claro indica el transcrito mayor de *rbcL* en wt el cual está ausente en *clb19*. Las flechas gris oscuro indican los transcritos grandes que sólo se detectan en *clb19*. b) Northern blots. Cada carril contiene 10 microgramos de RNA de plantas de 15 días wt, *clb19* o *clb6*. Las sondas usadas en cada caso están indicadas en a) son *atpB* ORF (1), *rbcL* 5' UTR (2), *rbcL* ORF (3), *rbcL* 3' UTR (4), *accD* 5' UTR (5), *accD* ORF (6) y *accD* 3' UTR (7). Marcador de peso molecular (MW) y membrana teñida con azul de metileno (MB) mostrada como control de carga. Los asteriscos y el signo (+) denotan el transcritos primarios o no procesados respectivamente. Tomada de Cheteigner-Boutin *et al.*, 2008.

Los defectos en la mutante *clb19* pueden ser explicados por la falta de edición. Primeramente, la edición del transcrito de *rpoA* cambia el codón que codifica a una serina hidrofílica por una fenilalanina hidrofóbica. La fenilalanina está codificada en el genoma cloroplástico de plantas como el arroz, maíz y briofitas, pero no en *Arabidopsis*, en donde se genera por edición. En bacterias la proteína RpoA contiene en la posición correspondiente una isoleucina, también hidrofóbica. En bacterias se sabe que la región que comprende al carboxilo terminal de RpoA se encarga de unir al promotor

mientras que su amino terminal permite el ensamblaje con otras subunidades del complejo de la polimerasa (Kimura *et al.*, 1994). Si el modelo bacteriano se aplicara a la PEP cloroplástica se puede especular que el cambio de aminoácido en la posición 67 en la parte del amino terminal en RpoA podría afectar el ensamblaje del complejo de PEP en la mutante *clb19*. Segundo, la falta de edición del transcrito de *clpP* podría causar defectos en la actividad del complejo catalítico ClpP/R/S de la proteasa Clp y contribuir al fenotipo de las plantas *clb19*, ya que se ha visto que la falta de la subunidad regulatoria clpR2 lleva a un fenotipo amarillo asociado con la reducción de la acumulación del complejo ClpP/R/S (Rudella *et al.*, 2006).

## 2.1. Antecedentes directos

Como se describió anteriormente la proteína CLB19 edita un sólo sitio en dos blancos diferentes. Por lo tanto, no es claro qué parte del fenotipo de esta mutante se debe a la falta de edición de *rpoA* y cuál a la de *clpP*. Para contestar esta pregunta se generaron dos tipos de plantas transgénicas que portan las versiones editadas de los genes RpoA y ClpP1 respectivamente. Ambos transcritos tenían fusionada la región que codifica el amino terminal de la proteína, con la secuencia que codifica al péptido de tránsito al cloroplasto (pTc) de la subunidad pequeña de la Rubisco (*rbcS*) y expresadas a partir del promotor fuerte CaMV35S (**Figura 15**). Cada una de dichas construcciones se introdujeron en plantas heterocigas para la mutación *clb19*. Líneas transgénicas independientes para cada una de dichas construcciones fueron seleccionadas y de ellas se obtuvo semilla y líneas homocigas (generación T2) para su análisis posterior. Estas líneas transgénicas fueron el objeto de análisis de esta tesis.



**Figura 15.** Esquema del vector pFGC1008 que contiene las versiones editadas de los genes *clpP* y *rpoA*. Cada una de las construcciones se introdujeron en plantas heterocigas para la mutación *clb19*.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Aún no está claro si algunas proteínas PPR son requeridas como un factor sitio específico para reconocer sitios de edición o si podrían tener funciones adicionales a la de reconocer su RNA blanco (Okuda y Shikanai, 2012).

No existe, evidencia experimental de que la proteína CLB19 se une específicamente a los transcritos *clpP1* y *rpoA*. Por lo que de comprobarse será de gran ayuda para entender como las proteínas PPR reconocen específicamente sus sitios blancos.

Existe poca evidencia experimental en la que se haya probado que las PPR se unen a la región específica a editar. Además el mecanismo de edición de C a U no se conoce. Aunado a esto no se ha identificado a la enzima que realiza la edición, se cree que pueden ser una transaminasa, citidina desaminasa o las proteínas PPR por sí mismas. Un reto mayor está en identificar todos los factores relevantes involucrados en la edición y elucidar el mecanismo exacto (Chateigner-Boutin y Small, 2011).

La edición en los transcritos de los plástidos probablemente corrige una mutación que ocurrió en la evolución de su genoma (Chateigner-Boutin y Small, 2011). En el genoma *A. thaliana* no se encuentra codificado el aminoácido correcto para tener la proteína funcional de RpoA o ClpP, contrario a algunas otras especies de plantas, donde el aminoácido correcto está codificado en su genoma (Chateigner-Boutin *et al.*, 2008). Por lo anterior, sería interesante conocer por qué se editan los transcritos *clpP* y *rpoA* en *A. thaliana*.

La mayoría de las proteínas PPR son importadas a la mitocondria o al cloroplasto, por lo que elucidar su función podría revelar muchas facetas importantes de la interacción y/o comunicación entre el núcleo y los organelos en las plantas (Saha *et al.*, 2007).

#### 4. OBJETIVOS

Objetivo general:

Análisis del mecanismo y función de la edición mediada por CLB19

Objetivos específicos:

- Caracterización fenotípica de plantas portadoras de las versiones editadas de *rpoA* y *clpP* en el fondo genético de *clb19*
- Caracterización molecular de plantas portadoras del transgen con las versiones editadas de cada uno de los blancos (*rpoA* y *clpP*).
- Análisis de la capacidad de unión de una versión truncada del dominio EE+ de CLB19 a los transcritos *rpoAEd* y *clpPEd in vitro*.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Material vegetal

En los análisis realizados se utilizó el siguiente material vegetal:

- a) *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia (Col-0)
- b) La mutante *clb19* cuyo fondo genético es Columbia
- c) Líneas transgénicas T2 clpPEd:pFGC1008 numeradas de la siguiente manera: 1'-6, 3-4, 1'-4, 2-4, 4-1, 3-1 y líneas rpoAEd:pFGC1008: 1-5, 3-3, 2'-5, 1'-6, 2-5, 2'-1.

### 5.2. Esterilización y estratificación de semillas

Antes de someterse a experimentación las semillas pasan por un proceso de esterilización y estratificación. El proceso de esterilización de semillas se realiza en una campana de flujo laminar. Las semillas se embeben en agua por 30 minutos. Posteriormente, se retira el agua y se añade un mililitro de etanol absoluto por un minuto. Se retira el etanol y se añade un mililitro de solución de hipoclorito de sodio al 20%, se agita durante siete minutos. Se retira la solución de hipoclorito y se realizan 3 lavados con agua estéril. Finalmente se agrega un mililitro de agua estéril. Una vez estériles pueden sembrarse en cajas Petri con medio GM (Apéndice I) que contiene las sales minerales de Murashige y Skoog (MS) 0.2X con todos los nutrientes necesarios para el crecimiento de las plantas, suplementado con 0.6% de sacarosa y solidificado con 1% de agar. El pH del medio se ajusta a 5.7 y se somete a esterilización en autoclave (120°C y 15 lb de presión por 20 min). Una vez sembradas las semillas en las cajas con medio someten a estratificación es decir, se colocan en total oscuridad a 4°C durante cuatro días.

### **5.3. Crecimiento de *A. thaliana* en sustrato**

Una vez transcurridos 10 días desde que se sembraron las semillas, las plántulas de *Arabidopsis* son transferidas a sustrato Metromix 200, el cual tiene tres partes de tierra y una de vermiculita. Las plantas se cultivan en un cuarto de crecimiento a 22°C y con un fotoperíodo de 16 horas de luz con 8 horas de oscuridad.

### **5.4. Cruzas dirigidas**

Para realizar las cruzas y obtener plantas dobles transgénicas se utilizan plantas adultas en etapa de floración. Para esto se toma el polen de la planta donadora y se transfiere al carpelo de la receptora. Se realizaron cruzas recíprocas entre plantas transgénicas *rpoAEd* y *clpPEd*. Las semillas se recolectan al madurar la silicua, de dos a tres semanas después de realizar la crucea.

### **5.5. Extracción de DNA**

Para el aislamiento de DNA genómico se utiliza la técnica de extracción por CTAB. De acuerdo a los siguientes pasos:

- Pulverizar el tejido vegetal con la ayuda de pistilos y nitrógeno líquido en un tubo eppendorf de 1.5 ml.
- Agregar 300 µl de buffer 2X CTAB (ver apéndice) e incubar a 65°C por 30 minutos. Posteriormente se deja enfriar.
- Añadir 300 µl de cloroformo y vortexear.
- Centrifugar por dos minutos a 13,000 rpm para separar las fases.
- Transferir la fase acuosa de arriba a un nuevo tubo.
- Agregar 300 µl de 2-propanol y mezclar.
- Centrifugar por 10 minutos para formar una pastilla de DNA.
- Remover el sobrenadante y lavar la pastilla con 500 µl de etanol al 70%.
- Centrifugar por 10 minutos.
- Remover el etanol y se deja secar el tubo.

- Agregar 50 µl de agua y mezclar.

El DNA extraído se puede cuantificar en el nanodrop

## 5.6. Análisis por PCR

### 5.6.1. Lista de oligonucleótidos

Nombre del oligonucleótido	Secuencia
CLB19-GW FW	5'-CAC CAT GGG TCT CCT TCC CGT-3'
CLB19-1102 RV	5'-ATT TGG CTT CAT TGG CAT GCT-3'
35s FW	5'-ATG ACG CAC AAT CC ACT ATC C-3'
rpoA Rv	5'-CTC TTC TT TTC ATT CCC-3'
APT1 FW	5' TCC CAG AAT CGC TAA GAT TGC C 3'
APT1 RV	5' CCT TTC CCT TAA GCT CTG 3'
clpP-574 RV	5'-TTA TTG AAC CGC TAC AAG-3'
clpP RV	5'-TTG AAC CGC TAC AAG ATC AAC-3'
T7 FW	5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG-3'
198 35s up FW	5'-CCA ACC ACG TCT TCA AAG CAA G-3'
rpoA-231 Rv	5'-GAT TCT TGA ATA CCT GCT-3'
PTrbcL	5'- ATG GCC TCT ATG ATC AGT-3'
M13 FW	5'-GTA AAA CGA CGG CCA G-3'

### 5.6.2. Reactivos PCR

Buffer PCR 10X    2.5 µl  
MgCl<sub>2</sub> 25 mM        2.5 µl  
dNTPs 10 mM        0.25 µl  
Oligo Fw (60 ng/µl) 1.0 µl  
Oligo Rv (60 ng/µl) 1.0 µl

### 5.6.3. Programa general para las reacciones

Paso	Temperatura °C	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94	3 min	1
Desnaturalización	94	30 s	35
Alineamiento	52-56 (Dependiendo de los oligos)	1 min	
Extensión	68	1 min/kb	
Extensión final	68	7 min	1

### 5.7. Electroforesis de DNA en gel de agarosa

Se funde agarosa al 1% (w/v) en buffer TAE (1X) (ver apéndice). Se agregan 2µl de bromuro de etidio (10mg/ml) en 100ml de agarosa fundida y se mezcla de manera homogénea. Se vierte la muestra en un portageles y se colca un peine de acuerdo al volumen de carga. Se deja polimerizar el gel, posteriormente se retira el peine y el gel se coloca en una cámara de electroforesis con TAE (1X). Se cargan las muestras de DNA mezcladas con buffer de carga (ver apéndice). El gel se corre entre 70-100 V de 15 a 20 minutos.

### 5.8. Extracción de proteínas

El tejido vegetal recolectado se pulveriza con la ayuda de nitrógeno líquido en un tubo eppendorf de 1.5 ml. Las muestras se resuspenden en proporción 1:1 v/v en un buffer desnaturizante de tipo Laemmli (Laemmli, 1970) (0.125 M Tris-Cl, pH 6.8, 20% v/v glicerol, 4% v/v SDS, 2% v/v 2-mercaptoetanol y SDS 2X). Las muestras se incuban a 95°C por cinco minutos. Los extractos de proteína se cuantifican con el método de Bradford (Bradford, 1976). En celdas para espectrofotómetro, se agregan 800 µl de agua destilada, 2 µl del extracto proteico y 200 µl de Bradford. Se agita la celda con su contenido y se lee a 595 nm en el espectrofotómetro.

## **5.9. SDS PAGE**

Para la electroforesis de proteínas las muestras y el marcador de peso molecular se corren en un gel desnaturizante SDS-poliacrilamida al 10% (ver apéndice) en un buffer de corrida Tris-glicina (25 mM Tris-HCl, 250 mM glicina, 0.1% SDS). Los geles se corren a 120 Volts durante aproximadamente 2 horas. El gel se puede teñir con azul brillante Coomassie R-250 para la visualización de proteínas o se puede usar para electrotransferir las proteínas a una membrana.

## **5.10. Western blot**

Los extractos proteicos se separan por SDS-PAGE al 10% y luego son transferidas a una membrana de nitrocelulosa por 90 minutos a 0.35 Amperes en una cámara de electrotransferencia con buffer (ver apéndice) a 4°C. La membrana que contiene las proteínas se tiñe con Ponceau's (ver apéndice) al 0.2% para verificar la presencia de proteínas, la cual puede ser usada como control de carga. Se bloquea la membrana con leche descremada al 5% en PBS (Ver apéndice) con Tween 20 al 0.1% por dos horas. Posteriormente, se elimina el exceso de leche mediante tres lavados sucesivos de al menos 5 minutos con la solución de lavado para Western blot (ver apéndice). Se agrega el anticuerpo primario en la solución de lavado con 2% de leche descremada se pone a incubar durante dos horas a temperatura ambiente. Se desecha la solución con el anticuerpo primario y se lava la membrana con 3 lavados sucesivos de al menos 5 minutos con la solución de lavado para Western blot. Después, se agrega el anticuerpo secundario (anti conejo o ratón) anti HRP con la solución de lavado durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se hacen tres lavados y por último un enjuague con agua. La membrana se revela mediante quimioluminiscencia usando el kit de Lumigen: se agrega 1 ml de Lumigen PS-3 detection reagent solution A y se le agrega 25 µl de lumigen Ps-3 detection solution B. La mezcla se esparce en la membrana y se coloca un film fotosensible.

### **5.11. Extracción de RNA**

El tejido vegetal se muele en mortero con ayuda de nitrógeno líquido, hasta obtener un polvo homogéneo, a 50-100 mg de este tejido pulverizado se le agrega TRIzol y se mezcla con la ayuda de un vórtex, se deja reposar por 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se adicionan 200 µl de cloroformo por cada mililitro de TRIzol utilizado y se agita en el vórtex, se centrifugan las muestras a 13,200 rpm durante 15 minutos a 4°C. La parte acuosa se transfiere a un tubo eppendorff limpio y se adicionan 500 µl de alcohol isopropílico por cada mililitro de TRIzol utilizado, se mezcla suavemente y se deja en reposo por 1 minuto a temperatura ambiente, se centrifuga nuevamente a 13,200 rpm durante 10 minutos a 4°C, se elimina el sobrenadante y se lava la pastilla con 1 ml de etanol al 75% por cada mililitro de trizol utilizado. Se mezcla en el vórtex y se centrifuga a 10,000 rpm por 5 minutos a 4°C para eliminar el etanol. Finalmente la pastilla se resuspende en 50 µl de agua miliQ estéril. Para determinar la concentración y pureza del RNA se cuantifica en el nanodrop.

### **5.12. Electroforesis de RNA**

El RNA extraído se separa en electroforesis en geles de agarosa al 1.8%. Se disuelve agarosa en el buffer FA1X (ver apéndice) y se funde por calentamiento. La mezcla fundida se mantiene a 65°C en un baño de agua, se le adicionan 1.8 ml de formaldehído al 37% y 1 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml). La mezcla se vierte sobre un molde de geles y se deja solidificar, el gel se coloca en la cámara de electroforesis con buffer de corrida. Antes de cargar las muestras en el gel, al RNA se le agrega 3 µl de buffer de carga y se calienta de 3-5 minutos a 65°C. El gel se corre aproximadamente a 100 V o 60 A durante al menos 1 hora (5-7 V por cm<sup>3</sup>) en buffer de corrida 1X (ver apéndice). La integridad del RNA se corrobora visualizando el gel usando el transiluminador de luz UV.

## **5.13. Northern blot**

### **5.13.1. Transferencia del RNA en el gel a la membrana de nylon**

Una vez corrido el gel de RNA se enjuaga con agua destilada y se coloca en un sistema de transferencia por capilaridad que consiste en verter 200 ml de SSC 10X en un recipiente rectangular, con ayuda de un soporte de acrílico se coloca un puente de papel filtro (Wathman #1) cuyos extremos quedan en contacto con la solución de SSC 10X. Encima del puente en orden ascendente se colocan en el gel, con el fondo de los pozos de carga hacia arriba, una membrana de nylon, dos recortes de papel filtro de la misma medida del gel y una pila de papel absorbente de varios centímetros de espesor. Para facilitar la transferencia se coloca encima un objeto pesado y el gel se deja transfiriendo por alrededor de 12 horas. Terminada la transferencia se retira la membrana junto con el gel y se marcan con lápiz los carriles de los pozos donde se cargaron las muestras finalmente la membrana se fija con luz ultravioleta (1200 microJ) y para verificar la transferencia, se tiñe con una solución al 0.1% de azul de metileno. Una imagen fotográfica de la membrana teñida se utiliza como control de carga.

### **5.13.2. Amplificación del gene que se utiliza como sonda radioactiva**

Los genes usados como sondas se obtuvieron por PCR tal y como se menciona en (Chateigner-Boutin *et al.*, 2008). Se utiliza un nucleótido marcado con fósforo radiactivo. La mezcla de reacción se realiza de la manera siguiente: en un tubo eppendorf se colocan 2  $\mu$ l de una solución de 5  $\mu$ g/ml de DNA, los oligonucleótidos de inicio y 12  $\mu$ l de agua, la mezcla se calienta a 95°C por 5 minutos y se coloca en hielo se agrega buffer de marcaje y la enzima Klenow. A continuación, en el área especialmente acondicionada para trabajo con radiactividad, se agregan 3  $\mu$ l de  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (10  $\mu$ Ci/ $\mu$ l, act. esp. 370 MBq/ml). La mezcla de reacción se coloca en una caja de acrílico y se incuba a 37°C de 10 a 20 minutos. La sonda se desnaturaliza calentando a 95°C por 10 minutos, se transfiere inmediatamente a hielo por 3 minutos y se centrifuga a 13,000 rpm por 30 segundos para recuperar la sonda y se agrega a la mezcla de hibridación.

### **5.13.3. Hibridación de la membrana**

Las membranas se lavan con agua destilada para eliminar el exceso de azul de metileno y se colocan en un tubo cilíndrico de vidrio con tapa de rosca. Donde se le agrega una solución de prehibridación (ver apéndice) incubándose en agitación continua a 65°C por un mínimo de dos horas antes de agregar la sonda radiactiva correspondiente. La membrana se deja hibridando de 6-24 horas en agitación continua a 65°C. Finalizada la hibridación, se retira la solución radiactiva y para eliminar la marca no incorporada, las membranas se lavan sucesivamente en las mismas condiciones de hibridación, con soluciones de SSC 2X, 0.5X y 0.1X con SDS 0.1% durante un mínimo de 10 minutos en cada solución. Después de un enjuague final en SSC 0.1X sin SDS a temperatura ambiente, las membranas húmedas se colocan en un cartucho fotográfico para exponer una película radiográfica (Kodak film, Medical X-ray general purpose Blue) a por al menos un día a -70°C. La película se revela manualmente hasta la aparición de la señal de autoradiografía.

### **5.14. RT-PCR**

#### **5.14.1. Reverso transcripción**

Para la reverso transcripción del RNA (RT) y la amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se sigue el protocolo de M-MLV Reverse Transcriptase de Invitrogen:

- 1.- Agregar 1 µl de oligo dT. De 1 ng a 5 µg de RNA total. 1 µl de dNTPs 10 nM. Llevar a 12 µl con agua destilada
- 2.- Calentar la mezcla a 65°C por cinco minutos y transferir a hielo. Añadir 4 µl de 5X First-Strand Buffer, 2 µl 0.1 M DTT y 1 µl de agua
- 3.- Mezclar suavemente los contenidos e incubar a 37°C por dos minutos
- 4.- Añadir 1 µl de enzima M-MLV RT
- 5.- Incubar 50 minutos a 37°C
- 6.- Inactivar la reacción incubando a 70°C por 15 minutos.

Ahora el cDNA se puede usar como molde para la amplificación por PCR. El cDNA se diluyó 1:10.

#### 5.14.2. Condiciones PCR (alinear unidades debajo de unidades, etc)

H <sub>2</sub> O	13.7 µl
Buffer PCR 10X	2.5 µl
MgCl <sub>2</sub> 50 nM	2.5 µl
dNTPs 10 mM	0.3 µl
Oligo Forward	1.0 µl
Oligo Reverse	1.0 µl
cDNA 1:10	2.0 µl
DNA polimerasa	2.0 µl

#### 5.14.3. Lista de oligonucleótidos

Nombre del oligonucleótido	Secuencia
35S FW	5'-ATG ACG CAC AAT CC ACT ATC C-3'
rpoA-231 Rv	5'-GAT TCT TGA ATA CCT GCT-3'
clpP-574 RV	5'-TTA TTG AAC CGC TAC AAG-3'

#### 5.14.4. Programa general para la reacción

Paso	Temperatura °C	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94	3 min	1
Desnaturalización	94	30 s	35
Alineamiento	52	1 min	
Extensión	68	1 min/kb	
Extensión final	68	7 min	1

## **5.15. Clonación del gen CLB19 $\Delta$ EE+**

Con el propósito de sobre-expresar y purificar la proteína CLB19 $\Delta$ EE+ para usarla en ensayos EMSA. El gen que codifica para CLB19 sin los dominios E y E+ se clonó en el vector de entrada del sistema Gateway pENTR D-TOPO que permite su posterior movilización hacia el vector destino pDEST17.

### **5.15.1. Purificación de DNA a partir de gel de agarosa**

El fragmento de DNA a clonar se obtiene por PCR a partir de DNA extraído de plantas silvestres. Después de la amplificación por PCR, la reacción es corrida en un gel de agarosa. El fragmento visualizado por tinción con bromuro de etidio se extrae del gel cortando con una navaja. El gel cortado se coloca en las columnas Wizard sobre un tubo eppendorf. Se centrifuga a 13,200 rpm por siete minutos.

### **5.15.2. Clonación en el vector pENTR D-TOPO**

Para la reacción de ligación en el vector pENTR<sup>TM</sup>/D-TOPO se siguen las especificaciones del protocolo "Cloning Kit Invitrogen pENTR D-TOPO". Se mezclan 4  $\mu$ L del producto de PCR purificado con 1  $\mu$ L de solución salina y con 0.8  $\mu$ L de vector pENTR D-TOPO, incubándose temperatura ambiente por 1 hr.

#### **5.15.2.1. Transformación por electroporación**

De la reacción de ligación descrita en el paso anterior se utilizan 2  $\mu$ L para transformar una alícuota de 50  $\mu$ L de células electrocompetentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Esta mezcla se coloca en una celda de electroporación y se le aplica un pulso de 1.8 kV en un electroporador (MicroPulser<sup>TM</sup> de BIO-RAD) se le agregan 700  $\mu$ L de medio LB líquido para recuperar las células y se incuban durante 45 minutos a 37°C. Se centrifuga por un par de minutos a 8,000 rpm. La pastilla de células se resuspende y se plaquea en

cajas Petri con medio LB sólido suplementado con el antibiótico al que el vector confiere resistencia (kanamicina 50 mg/ml). Las cajas se incuban durante 8 a 12 horas a 37°C o hasta que el crecimiento de colonias sea evidente. Para confirmar la entrada del vector se hace PCR en colonia.

#### **5.15.2.2. Miniprep**

Una vez confirmada la presencia del vector por PCR, una colonia se inocular en 5 mL de LB líquido con el antibiótico y se deja incubar por 12 horas 37°C. Para purificar el plásmido se sigue el protocolo “Plasmid DNA purification using the QIAprep Spin Miniprep Kit and Microcentrifuge”. El plásmido obtenido se cuantifica en el nanodrop.

#### **5.15.3. Movilización de gene del vector de entrada a vector destino**

Se sigue el protocolo de Gateway LR Clonase II:

- 1 µL Clona de entrada (50-150 ng)
- 2 µL Vector destino pDEST17 (150 ng/ µL)
- 1 µL miQ H<sub>2</sub>O
- 1 µL Enzima LR Clonase II

La mezcla se deja incubar por 2 horas a 25°C .

Se electroporan células de *E. coli* (ver sección 5.15.2.1) con 4 µl de la reacción anterior utilizando ampicilina a 100 mg/ml para la selección del vector pDEST17. La verificación de las construcciones en el vector pDEST17 se realiza por PCR en colonia. Las colonias seleccionadas se emplean para la purificación de DNA plasmídico (ver sección 5.15.2.2.) y se usa para transformar cepas capaces de reproducir la proteína correspondiente en *E. coli* (cepa BL21<sup>TM</sup> Invitrogen Life Technologies).

### **5.16. Sobreexpresión de la proteína**

Para sobreproducir la proteína CLB19 $\Delta$ EE+ se transforma la cepa de *E. coli* BL21 con el vector pDEST17 que contiene la secuencia que codifica a la proteína CLB19 deletada de los dominos E y E+. Una vez que se confirma la transformación de las células por PCR en colonia. Una colonia transformada se inocula en 5 ml de medio LB líquido suplementado con el marcador de selección (ampicilina 100 mg/ml) y se deja crecer por aproximadamente 8 horas a 30°C con agitación. Estos 5 ml se utilizan para inocular 50 ml de medio LB con el marcador de selección, se incuba a 30°C con agitación hasta que alcance una  $A_{600\text{nm}}$  de entre 0.4-0.6 nM. Para determinar el tiempo de máxima acumulación de proteínas, a dicho cultivo se le adiciona IPTG a una concentración final de 500  $\mu\text{M}$  y se realiza una cinética con un tiempo final de 10 horas tomando muestras de 1 ml a intervalos de dos horas. Para establecer el mejor tiempo de inducción, las muestras de la cinética se resuelven en un gel de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturizantes (ver apéndice). Cuando la sobre-expresión de proteína no fue evidente en el gel de poliacrilamida se realiza un western blot anti-His, ya que la proteína está abanderada por una cola de seis histidinas. Una vez determinado el tiempo de máxima concentración proteica, se repite el proceso de inducción con IPTG colectando todo el medio de cultivo (50 ml) al tiempo óptimo de sobre-expresión y se centrifuga a 8000 rpm durante 10 min. La pastilla obtenida se puede procesar inmediatamente o almacenar a -20°C hasta el momento de su utilización.

### **5.17. Purificación nativa de la proteína**

La purificación nativa de la proteína sobre-expresada en *E. coli* BL21 se realiza de acuerdo al protocolo QIAexpressionist de QIAGEN. Se descongela la pastilla en hielo y se resuspenden las células en 5 ml de buffer de lisis con 10 mM de imidazol (ver apéndice). Se agrega lizosima a 1 mg/ml y se incuba en hielo por 30 minutos. Se sonica diez minutos dos veces con pulsos de 10 segundos a 50 W de amplitud con un descanso de cinco minutos. Una vez obtenido el lisado. Se agrega RNasa A (10  $\mu\text{g/ml}$ ) y DNasa I (5  $\mu\text{g/ml}$ ) y se incuba en hielo de 10 a 15 minutos. Se centrifuga a 8,000 x g

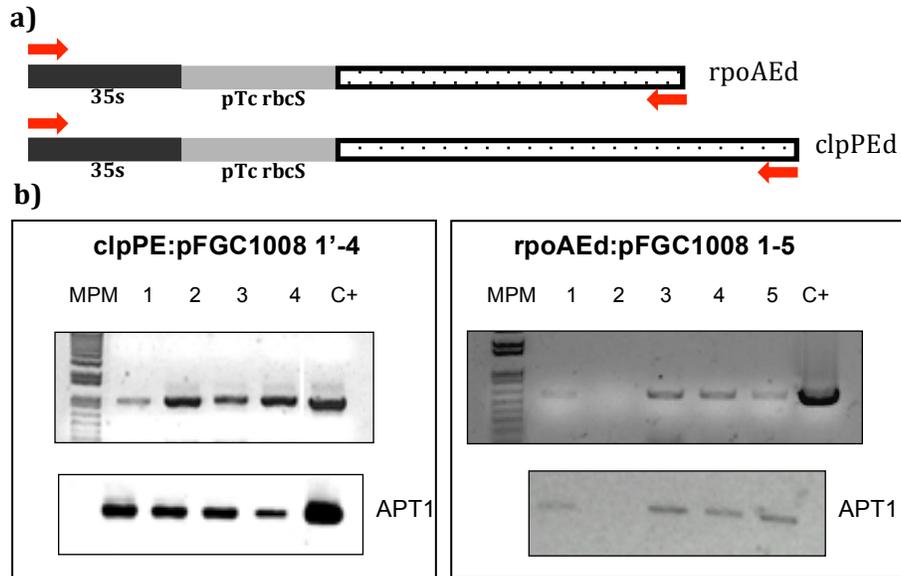
por 25 minutos a 4°C. Se guarda el sobrenadante para un posterior análisis por SDS-PAGE. Para seis mililitros del lisado sonificado se agrega 1 ml de la resina Ni-NTA 50%. Se mezcla en un rotor a 200 rpm a 4°C por 4 horas. La mezcla se pone en la columna y se colecta el flow through, para analizar por SDS PAGE. Ahora con el buffer de lavado (ver apéndice) se pasa dos veces por la columna y se colectan fracciones para el análisis por SDS PAGE. Se eluye la proteína 4 veces con 0.5 ml de buffer de elución (ver apéndice). Se colectan las eluciones (0.5 ml) en 4 tubos para su análisis por SDS-PAGE a estas fracciones se les puede agregar un inhibidor de proteasa. Una vez colectadas todas las fracciones, se someten a un análisis de SDS PAGE para encontrar la fracción donde se recupera la proteína purificada. La identidad de la banda de la proteína purificada se puede confirmar mediante un Western blot.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Las versiones editadas de los genes *rpoA* y *clpP* en el fondo *clb19*, por separado no son capaces de complementar el fenotipo.

Debido a que la mutante *clb19* afecta la edición de dos diferentes transcritos, se planteó el objetivo de atribuir qué parte del fenotipo inicialmente caracterizado se debe a la falta de edición del mensajero de *rpoA* o al de *clpP*. Con este objetivo se generaron plantas transgénicas que portan a las versiones editadas de los genes *rpoA* y *clpP1* respectivamente como se muestra en la **figura 15**.

Se analizaron las plantas transgénicas que portan la secuencia de *rpoA* o la secuencia de *clpP* editadas por separado. Para comprobar que realmente las plantas transgénicas tuvieran la citocina editada a uridina se extrajo DNA de las plantas, se amplificó el transgen y se secuenció, confirmando de esta manera que efectivamente cada una de las plantas transgénicas correspondiente contenían el gen editado. Posteriormente, se analizaron plantas transgénicas T3 de 12 líneas independientes, seis para el gen editado de *clpP* y seis con el gen editado de *rpoA*. Fueron nombradas *clpPEd* o *rpoAEd* y a continuación el número que las identifica (Tabla 2). Como las construcciones de ambas líneas tienen el marcador de resistencia a higromicina, estas 12 líneas se cultivaron en presencia del antibiótico. A primera vista, se observaron plántulas amarillas básicamente indistinguibles a las plántulas *clb19*. Con el propósito de analizar la presencia o ausencia de los genes editados en las plántulas amarillas, se realizaron PCRs con oligonucleótidos específicos que permitían amplificar el transgen *clpP* editado (*clpPEd*) o *rpoA* editado (*rpoAEd*) según fuera el caso. En la **figura 16** se muestran los productos amplificados por PCR de dos líneas transgénicas demostrando la presencia de los transgenes correspondientes. Los PCR confirmaron la presencia de los transgenes correspondientes aún en las plántulas amarillas de cuatro líneas independientes de *clpPEd* y en seis líneas independientes de *rpoAEd* (**Tabla 2**).



**Figura 16.** PCR de plántulas transgénicas *clpPEd* y *rpoAEd*. a) Representación esquemática de las construcciones que contienen las versiones editadas de *rpoA* y *clpP*. Las flechas rojas muestran los oligos que se usaron para amplificar los transgenes. B) Productos amplificados por PCR que confirman la presencia del transgen *rpoAEd* o *clpPEd*. Como control positivo (C+) se utilizó un plásmido purificado pFGC1008 con la construcción *rpoAEd* o *clpPEd* según fuera el caso. Marcador de peso molecular (MW). Adenina fosforibosil transferasa 1 (APT1) utilizado como control de carga.

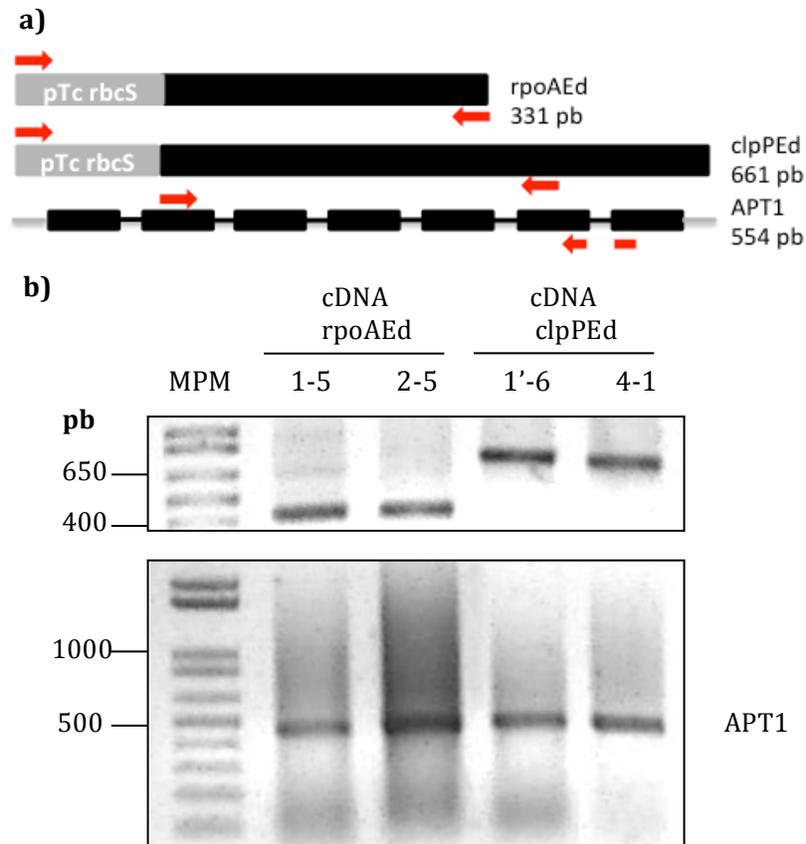
**Tabla 2.** Líneas transgénicas analizadas de *rpoAEd* y *clpPEd*, se muestra el número de plántulas amarillas analizadas (n) y el número de plántulas amarillas que contienen el transgen (m).

Nombre de la línea	n	m
<i>clpPEd</i> :pFGC1008 1'-6	5	5
<i>clpPEd</i> :pFGC1008 3-4	5	0
<i>clpPEd</i> :pFGC1008 1'-4	5	5
<i>clpPEd</i> :pFGC1008 2-4	5	5
<i>clpPEd</i> :pFGC1008 4-1	5	4
<i>clpPEd</i> :pFGC1008 3-1	5	0
<i>rpoAEd</i> :pFGC1008 1-5	4	4
<i>rpoAEd</i> :pFGC1008 3-3	5	1
<i>rpoAEd</i> :pFGC1008 2'-5	5	4
<i>rpoAEd</i> :pFGC1008 1'-6	4	3
<i>rpoAEd</i> :pFGC1008 2-5	5	4
<i>rpoAEd</i> :pFGC1008 2'-1	4	1

Con base en los resultados anteriores, pareciera que las versiones editadas de cada uno de los genes *rpoA* y *clpP* por separado, no parecen ser capaces de complementar el fenotipo amarillo de *clb19*. Este resultado es inesperado ya que la hipótesis era que cada uno de los transcritos editados debería de ser capaz de complementar por lo menos parte del fenotipo amarillo y por lo tanto se esperaba que el fenotipo de las plantas complementadas presentara una mejora con respecto a la mutante original.

Una posible explicación de estos resultados podría ser que ambos transcritos, cada uno por separado, generan un defecto en el desarrollo tal que resulte en un fenotipo amarillo. Sin embargo, este resultado podría también deberse a que las construcciones tuvieran algún problema técnico. Con el propósito de discernir y eliminar que la falta de complementación pudiera deberse a un problema meramente técnico, primeramente se decidió corroborar la presencia del transcrito de cada uno de los transgenes *rpoAEd* y *clpPEd* en las plántulas amarillas. Para esto se llevó a cabo una reacción de RT PCR para buscar la presencia de los transcritos correspondientes. El cDNA que se obtuvo fue usado como molde para buscar por PCR la presencia de ambos transcritos editados. Se obtuvieron productos amplificados y de esta manera se demostró la presencia del mensajero de *rpoAEd* y de *clpPEd*. El transcrito endógeno se descartó porque los transgenes se amplificaron usando un oligonucleótido correspondiente a la secuencia que codifica al péptido de tránsito al cloroplasto (**Figura 17**).

Aún cuando existe mensajero editado tanto para *rpoA* como para *clpP* en las plántulas *clb19* amarillas. A primera vista las plántulas no muestran una mejora en su fenotipo.



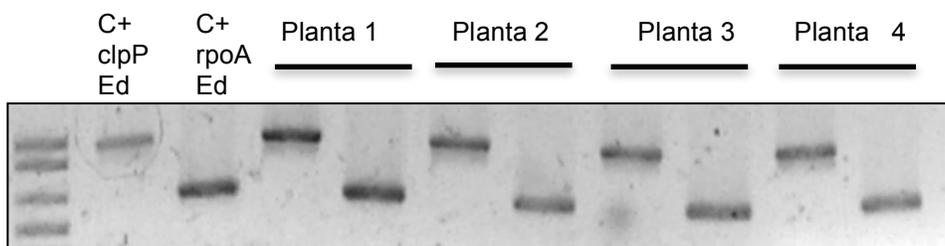
**Figura 17.** RT PCR de plántulas amarillas transgénicas para analizar la presencia de transcrito *rpoAEd* o *clpPEd*. a) Se muestran los oligonucleótidos usados para amplificar el cDNA obtenido de la reverso transcripción. b) Productos amplificados por PCR usando como molde cDNA de líneas transgénicas de *rpoAEd* y *clpPEd*. Como control (para descartar contaminación de DNA genómico) se muestra la amplificación de APT1 usando oligonucleótidos específicos para la región codificante.

## 6.2. La presencia de ambos transgenes en plantas *clb19* no complementa el fenotipo de amarillamiento.

Habiendo demostrado que existen plántulas amarillas que portan en su genoma las versiones editadas para *rpoA* y *clpP* en cada caso, resultaba importante demostrar la funcionalidad de los transgenes. Con esta idea se planteó que la presencia de los dos genes editados en el fondo mutante *clb19* tendría forzosamente que complementar y restaurar el fenotipo de dicha planta semejándose al de una planta silvestre. Dicho análisis también presupone que no existirá ninguna planta albina que contenga a ambos transgenes. Con el propósito de introducir ambos genes en *clb19* se realizó una cruce entre una planta heterociga para la mutación *clb19*, que además portara el gen

editado de *clpP* (Línea *clpPEd* 1'-4), con la planta heterociga para *clb19* que portara el gen editado de *rpoA* (Línea *rpoAEd* 2'-5).

Las semillas obtenidas de esta cruce germinaron en medio GM suplementado con los antibióticos higromicina (50 µg/µl) y kanamicina (50 µg/µl). De dicha cruce se obtuvieron plántulas verdes y amarillas y a varias de las plántulas amarillas se les extrajo DNA para buscar la presencia de ambos transgenes a través de PCR. Mediante este análisis se comprobó que algunas plantas amarillas contenían ambos transgenes (Figura 18).

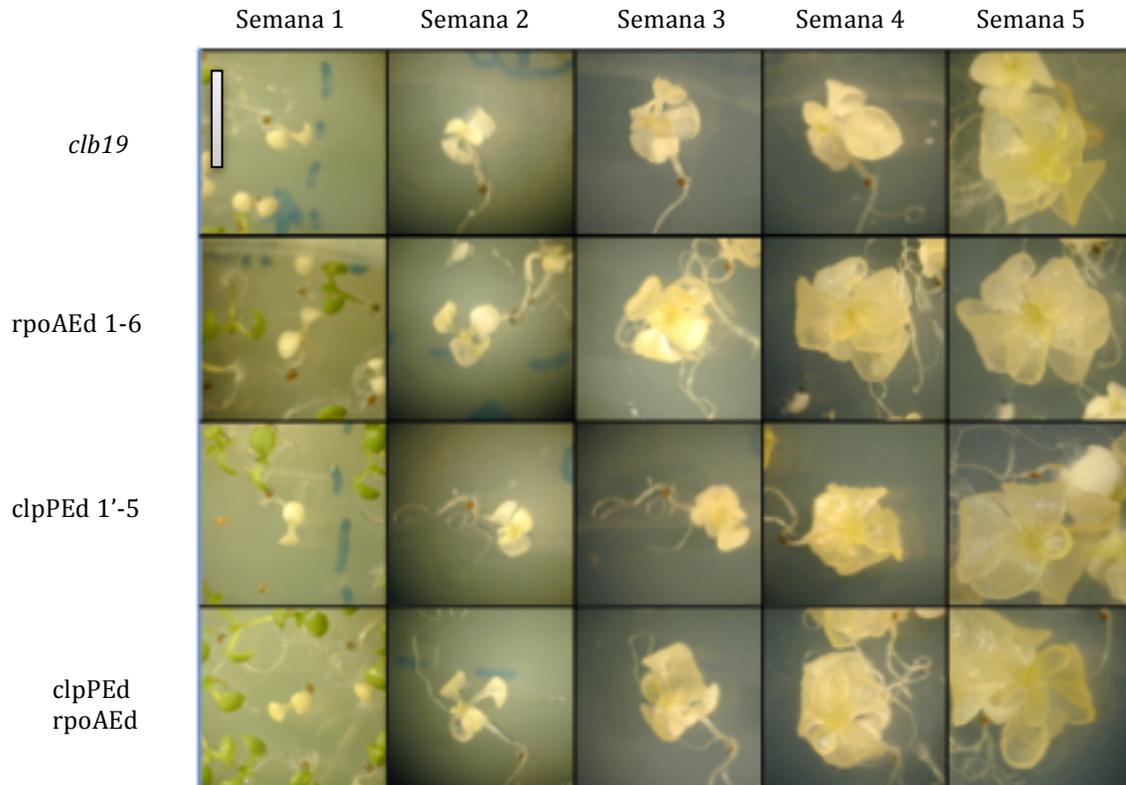


**Figura 18.** Productos de PCR que muestran la presencia de ambos transgenes en plántulas amarillas. Como control positivo se uso el plásmido que contiene las versiones editadas de *clpP* y *rpoA*.

A partir de este análisis se pudo demostrar que la presencia de ambos transgenes en plantas *clb19* no complementa el fenotipo de amarillamiento.

### **6.3. Las plantas amarillas transgénicas para *rpoAEd*, *clpPEd* y la doble transgénica no muestran una diferencia en su morfología y desarrollo en comparación con *clb19***

Con el propósito de caracterizar morfológicamente las plántulas amarillas *clb19*, *rpoAEd*, *clpPEd* y la doble transgénica y buscar algún fenotipo evidente se realizó un análisis comparativo entre ellas. Cada una de las líneas se siguió durante 5 semanas y se comparó con la mutante *clb19* original, como se ve en la figura 19 y se observó que ninguna de las líneas mostró una diferencia notable, entre ellas, en su morfología y su desarrollo durante todo este periodo.

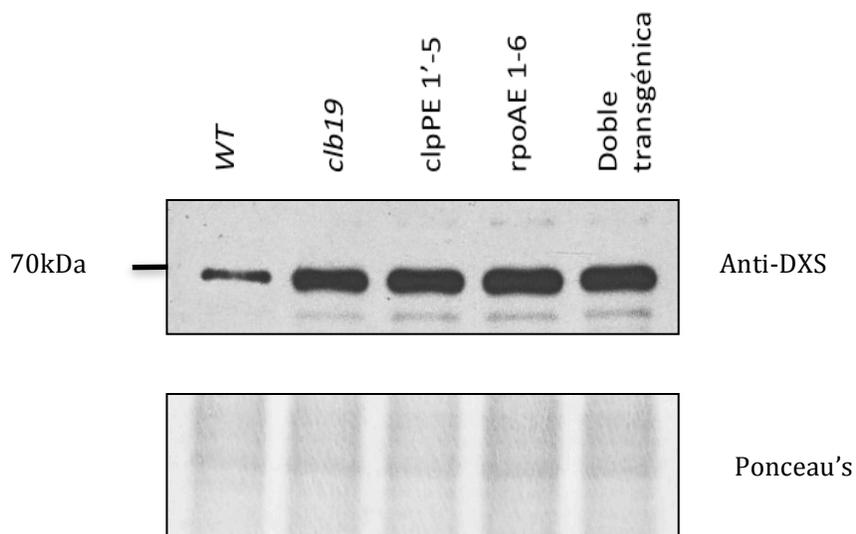


**Figura 19.** Desarrollo comparativo de líneas transgénicas amarillas vs *clb19*. La barra gris indica 4 mm.

#### 6.4. La actividad de la proteasa Clp no mejora en las líneas portadoras de la versión editada de *clpP*

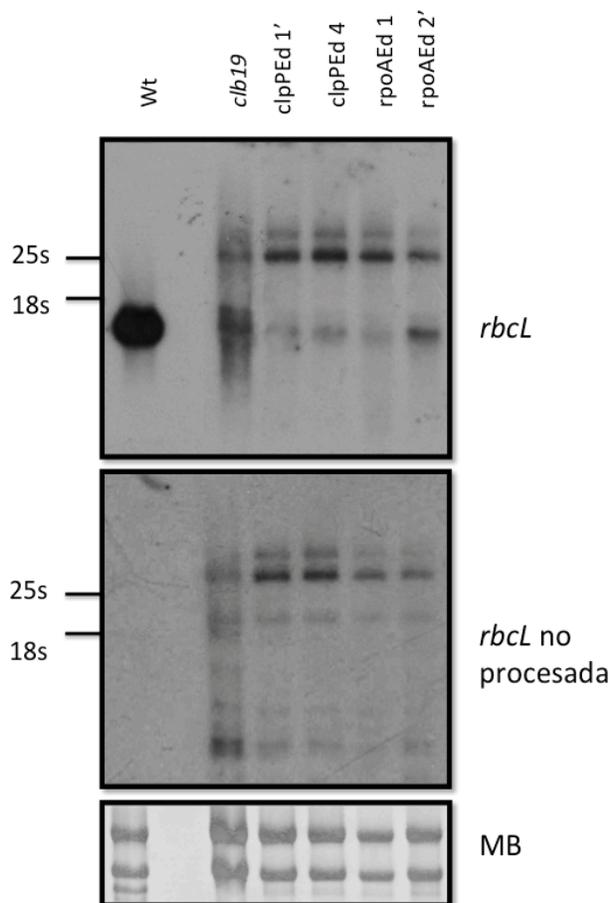
Una manera de caracterizar molecularmente la actividad de la proteasa Clp en las plantas portadoras del transgen con las versiones editadas para el gen *clpP1* y en plantas portadoras de ambos transgenes, es proporcionando evidencia experimental de la funcionalidad del complejo proteasa Clp, que se encarga de la degradación de proteínas en el estroma del cloroplasto. Es probable que la falta de edición del transcrito de la subunidad cloroplastica ClpP1 que es una de las subunidades catalíticas, tenga un efecto alterando la actividad de la proteasa Clp. Anteriormente, se ha hipotetizado que algunas enzimas de la vía MEP, que se localizan en el estroma del cloroplasto, podrían ser blanco, directo o indirecto, de Clp. En el trabajo de Flores-Pérez *et al.*, 2008 se mostró que la represión de la actividad de Clp en plástidos resulta en la acumulación de enzimas de la vía MEP: como DXS (1-Deoxixilulosa 5-fosfato

sintasa) y DXR(1-Deoxixilulosa 5-fosfato reductoisomerasa). En la mutante *clb19* previamente se ha observado que la enzima DXS se encuentra claramente aumentada. Con este antecedente, se analizó por ensayos de proteína tipo Western blot si las plántulas transgénicas que contienen la versión editada para el gen *clpP1* los niveles de DXS son mas parecido al de la planta silvestre. Al realizar estos ensayos con un anticuerpo anti-DXS, se observó que las líneas transgénicas existe una mayor acumulación de DXS que en la planta silvestre y de manera parecida a los que se observan en la mutante *clb19* original (**Figura 20**). Por lo tanto estos datos indican que se sigue acumulando la enzima DXS y podemos suponer que la actividad de la proteasa sigue comprometida en las líneas transgénicas.



**Figura 20.** Western blot anti-DXS de plántulas amarillas de 15 días silvestres (wt), *clb19*, *clpPEd 1'-5*, *rpoAEd 1-6* y doble transgénica. Se cargaron 15 µg de proteínas. Tinción con Ponceau's se muestra como control de carga.

## 6.5. La actividad de PEP no mejora en las líneas portadoras de la versión editada de *rpoA*



**Figura 21.** Análisis de la expresión del gen *rbcl* en planta silvestre, *clb19*, *clpPEd 1'*, *clpPEd 4*, *rpoAEd 1* y *rpoAEd 2'*. El RNA fue aislado de plántulas de 15 días. (MB) Membrana teñida con azul de metileno.

La caracterización inicial de la mutante *clb19* mostró que existen cambios en los perfiles de transcripción de diversos genes codificados en el cloroplasto. En este análisis se demostró que existen transcritos, que se acumulan en niveles mayores en la mutante que en la planta silvestre. Esta acumulación se debe a que los transcritos son expresados a partir de la polimerasa codificada en el núcleo (NEP). De manera paralela, se encontró que aquellos transcritos expresados a partir de la polimerasa cloroplástica (PEP) o por ambas polimerasas (NEP y PEP) se acumulan a muy bajos niveles y presentan defectos en el procesamiento (**Figura 14**). Por lo tanto, se procedió a realizar una caracterización molecular de las plantas que expresaban el transcrito editado de *rpoA*. Esto se realizó mediante un análisis de los transcritos cloroplásticos a través de hibridaciones

RNA:DNA tipo Northern blots, hibridando contra la región codificante del gen de *RbcL*. Sabiendo que el gen de *RbcL* es transcrito primordialmente por la polimerasa PEP, se procedió a analizar su patrón de transcripción en plántulas mutantes *clb19*, plántulas con la versión editada de *rpoA* y como un control adicional, plántulas con la versión editada de *clpP1*. El análisis de Northern blot mostró una disminución en la acumulación del transcrito maduro de *rbcl* en la mutante *clb19*, consistente con el patrón

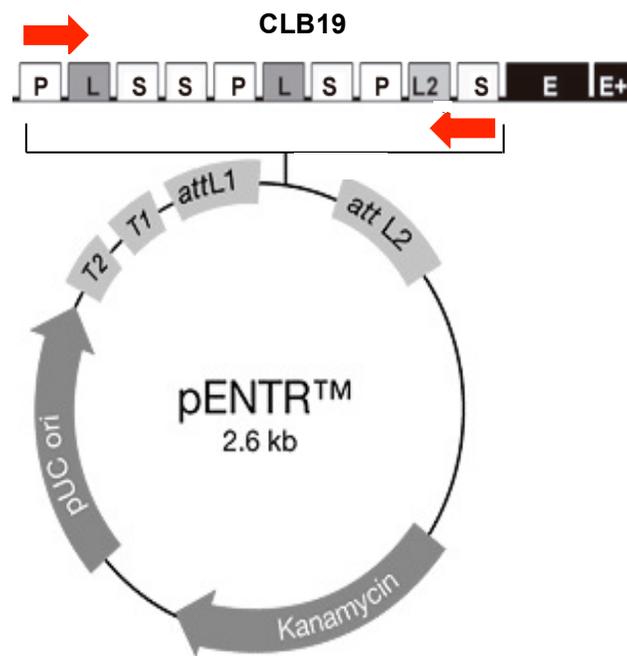
previamente reportado por Chateigner-Boutin *et al.*, (2008). Este perfil de transcripción fue muy semejante en todas la plántulas transgénicas (tanto las que contenían *RpoA* como *clpP* editado y la doble transgénica) También se híbrido contra la sonda que contiene regiones no codificantes de *rbcL*. En la planta silvestre no se observó acumulación de transcrito, en cambio en la mutante *clb19* y las líneas transgénicas se observó un perfil de transcritos muy similar (**Figura 21**). Estos datos indican que hay una nula recuperación en la actividad de PEP en las plantas transgénicas, ya que el perfil de transcripción de *rbcL* (usando ambas sondas) se muestra prácticamente igual que en *clb19*.

### 6.6. Obtención de la proteína nativa CLB19 sin los dominios E y E+

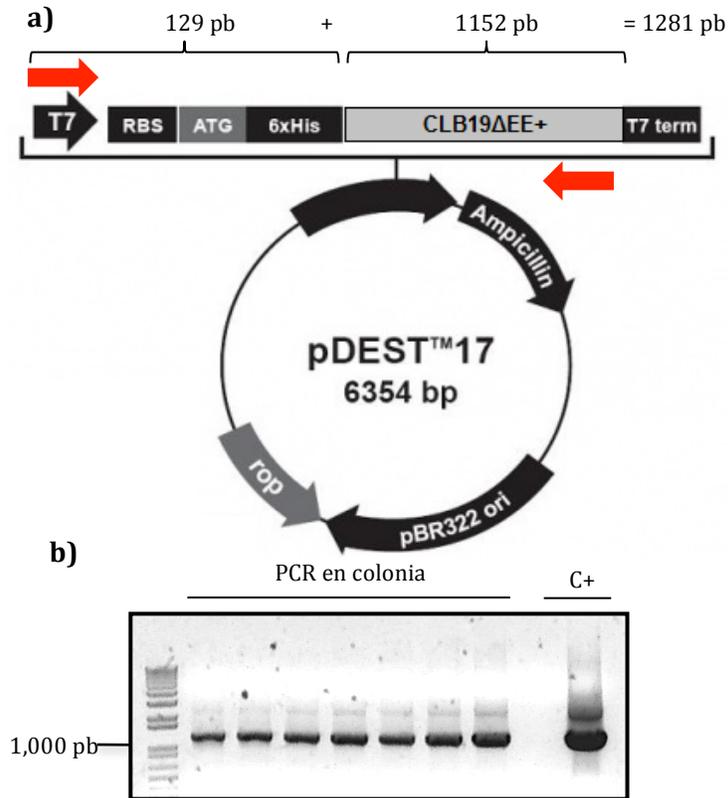
Previamente, se ha demostrado que la mutante *clb19* complementada con la proteína truncada de los dominios E y E+ no es capaz de complementar el fenotipo amarillo (Ramos-Vega, datos no publicados). Esto sugiere que los dominios E y E+ tienen una función importante para el proceso de edición. Resultados similares fueron reportados anteriormente en la proteína CRR4 que es también una PPR de la subclase E, como *clb19*. También se demostró que CRR4 con una delección del dominio E ( $\Delta EE+$ ) es capaz de unirse a su blanco (Okuda *et al.*, 2007). Basados en este antecedente, y para caracterizar a mayor detalle la función de estos dominios, se decidió analizar si CLB19  $\Delta EE+$  es capaz de unirse a sus blancos en condiciones *in vitro*. Por lo tanto se decidió sobre-expresar la proteína CLB19  $\Delta EE+$  en bacteria y posteriormente purificarla para ser usada en ensayos de retardo de la migración electroforética (EMSA). Para este objetivo, el gen *CLB19* se amplificó por PCR desde el codón de inicio hasta antes de los dominios E (**Figura 22**). Este fragmento se clonó en un vector de entrada pENTR del tipo Gateway (**Figura 22**) y posteriormente la construcción se transfirió al vector de destino final conocido como pDEST17 el cual que cuenta con un epítipo de seis histidinas en el amino terminal, para posteriormente dirigir su sobreexpresión y sobreproducción de proteínas en *E. coli*. Primeramente, se verificó la inserción del gen de interés en el vector destino amplificando por PCR la región que abarca desde el

promotor T7 hasta donde termina la región que codifica para la proteína CLB19 truncada (**Figura 23**).

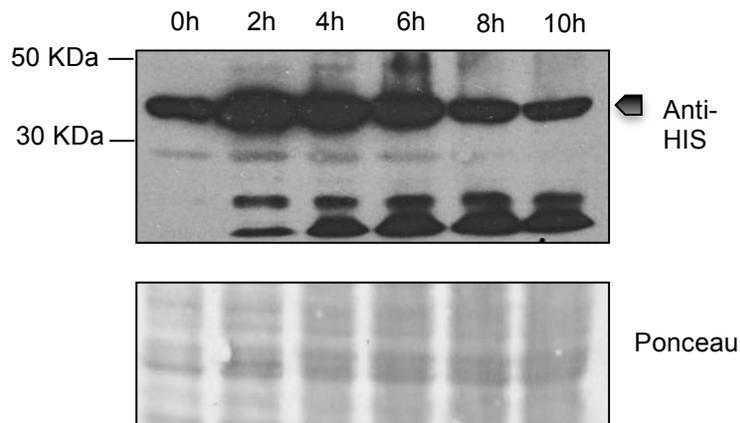
Para encontrar el tiempo óptimo de sobreexpresión de la proteína se realizó una cinética de inducción. La cepa de *E. coli* BL21 con el vector pDEST17 se inoculó y se incubó hasta que el cultivo alcanzó una  $A_{600}$  de entre 0.4 a 0.6 nM, se le agregó el inductor (IPTG 500 $\mu$ M), se tomaron muestras cada dos horas durante diez horas. Mediante la detección de la proteína truncada a través de Western blots, utilizando los anticuerpos anti histidina, se demostró que el mejor tiempo de inducción de las bacterias era a las 4 horas, ya que en tiempos posteriores se detectó una degradación de la proteína (**Figura 24**). Por lo tanto, las condiciones óptimas establecidas de inducción con IPTG (500  $\mu$ M) fueron 4 horas, para una vez llegado ese tiempo recolectar el cultivo para continuar con la purificación.



**Figura 22.** Representación esquemática de la clonación de la proteína CLB19  $\Delta$ EE+ en el vector de entrada pENTR. La proteína truncada se clonó a partir de PCR usando como molde DNA genómico de una planta silvestre. Las flechas rojas indican los oligonucleótidos usados.

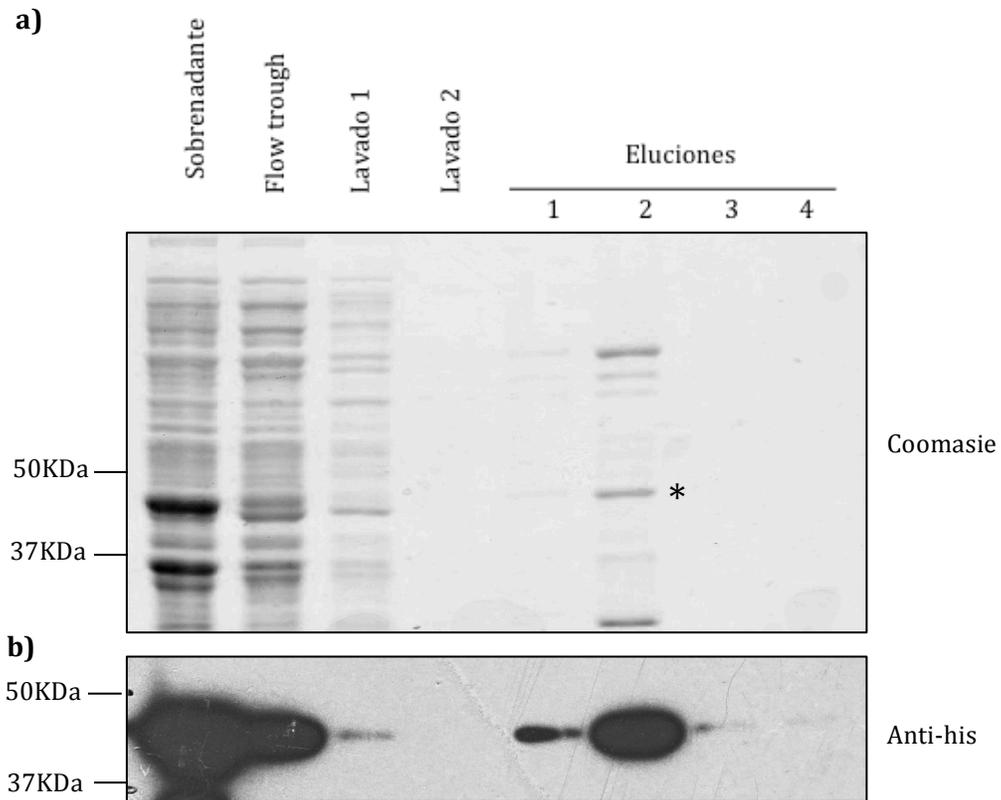


**Figura 23.** a) Clonación de la proteína CLB19  $\Delta$ EE+ en el vector destino pDEST17. b) Se corroboró la inserción del gen de interés en el vector destino pDEST17 mediante PCR en colonia.



**Figura 24.** Cinética de inducción de la expresión de CLB19  $\Delta$ EE+. Western blot anti-His para seguir la inducción de CLB19  $\Delta$ EE+ con 500  $\mu$ M de IPTG de 0 a 10 horas. Siendo el mejor tiempo de inducción entre 2 y 4 horas. Se cargo un total de 10  $\mu$ g de proteína. Tinción con Ponceau se muestra como control de carga.

Se decidió aislar la proteína CLB19 deletada de los dominios E/E+ con un método de purificación nativa, utilizando una columna de afinidad Ni-NTA para la unión de proteínas abanderadas con histidinas. Después varias purificaciones, en una de ellas se recuperó la mayor cantidad de proteína, correspondiente con el peso molecular esperado, y se corroboró que fuera la proteína de interés, mediante un Western blot utilizando como primer anticuerpo un anti-Histidina (**Figura 25b**). En otros intentos de purificación no se lograba obtener la proteína, por lo que se cambiaron algunas condiciones; se optó por partir de un cultivo de 50 ml. El extracto total de proteínas se dejó interactuar con la resina de Ni-NTA por cuatro horas y se realizó sólo un par de lavados. Finalmente, en la segunda elución de la purificación se recuperó la proteína CLB19 $\Delta$ EE+ aunque con otras proteínas (**Figura 25a**). Esto podría deberse a que algunas proteínas no abanderadas interactuaron con la resina de Ni-NTA, ya que este fenómeno se da a mayor frecuencia cuando se hace una purificación nativa que con una purificación desnaturalizante (como se explica en el protocolo The Qiaexpressionist, 2003).



**Figura 25.** Purificación en condiciones nativas. a) CLB19  $\Delta$ EE+ se expresó en la cepa BL21 y se purificó usando una columna de Ni-NTA Agarosa con diferentes concentraciones de imidazol (ver materiales y métodos) en los pasos de lavado y elución. Se cargaron 40  $\mu$ g de proteína. Las proteínas están teñidas con azul de Coomasie. b) Para confirmar la presencia de la proteína recombinante se realizó una inmunodetección contra His.

## 7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En la mayoría de los casos, la edición en organelos restaura secuencias o estructuras filogenéticamente conservadas en todo tipo de RNA, de esta manera se restauran los productos funcionales codificados en el RNA. La edición del RNA puede ser vista como un mecanismo de reparación para corregir mutaciones en el genoma de los organelos. Otra explicación de la función de la edición en organelos, puede ser que se editan transcritos diferencialmente y esto pudiera regular la expresión del transcrito en el tejido donde la proteína se necesita. Además la edición parcial, puede hacer que transcritos no editados puedan ser traducidos en proteínas alternativas estables y estas a su vez puedan tener diferentes características, funciones o ser inactivas. También existe la posibilidad, de que variaciones en la edición puedan controlar la cantidad de complejos activos, o cambiar las características o funciones de dichos complejos (Chateigner-Boutin y Small, 2011).

En el caso particular de CLB19, se ha determinado que es importante para la edición de dos transcritos, *rpoA* y *clpP*. Ambos mensajeros codifican para proteínas de función crítica para el cloroplasto. El transcrito de *rpoA* codifica para la subunidad alfa de la PEP, que se cree que transcribe genes fotosintéticos y el transcrito de *clpP* codifica para la subunidad catalítica de la proteasa Clp (Chateigner-Boutin *et al.*, 2008). Debido a que en la mutante *clb19* está afectada la edición de estos dos transcritos, en este trabajo se trató de evaluar qué parte del fenotipo, inicialmente caracterizado, se debe a la falta de edición de *rpoA* o de *clpP*. Se trató de evaluar dicha pregunta a través del análisis de las plantas transgénicas, que portan las versiones editadas de los genes *rpoA* o *clpP1* por separado (**Figura 15**). El análisis fenotípico, inicial, de estas plantas transgénicas mostró que no existe una mejoría aparente del fenotipo amarillo descrito para la mutante *clb19*, a pesar de que se confirmó la presencia de los mensajeros de los transcritos editados que están codificados en los transgenes (**Figura 17**). A primera instancia, estos datos sugerirían que la falta de edición, de cada uno de los transcritos, resulta en un fenotipo amarillo (de bajos pigmentos). Esto implicaría que para una reversión del fenotipo amarillo es necesaria la presencia de ambos transcritos editados

en el fondo mutante *clb19*. Esta posibilidad fue analizada en el presente trabajo a través del análisis del fenotipo de plantas transgénicas que portaran ambos transgenes en su genoma. El análisis fenotípico de estas dobles transgénicas mostró que aún se segregan plántulas amarillas en proporción 3:1 y que no existe una mejora evidente en su pigmentación (datos no mostrados). Este fenotipo se mantiene durante diferentes etapas del desarrollo y es similar al de la mutante *clb19* (**Figura 19**). Estos resultados nos permiten concluir que desafortunadamente este análisis no mostró diferencias morfológicas ni de pigmentación durante el desarrollo en las líneas transgénicas.

Una posibilidad, que explica estos resultados es que las construcciones con las versiones editadas para cada gen no son funcionales. Como un primer análisis se confirmó la presencia de los mensajeros para cada una de las transgénicas (**Figura 17**). Lo que implica que el transgen si está siendo expresado. Sin embargo, con este análisis no se puede asegurar que estos transcritos sean traducidos correctamente, y que sus proteínas sean importadas correctamente al cloroplasto para cumplir su función. Con base en nuestras construcciones, las proteínas RpoA y ClpP, producto de los transgenes, deberían de ser sintetizadas en el citosol y poder trasladarse al interior del cloroplasto, ya que cuentan con el péptido de tránsito de la subunidad pequeña de la RUBISCO. Está demostrado que el péptido de tránsito, que se utilizó en estas construcciones es suficiente y eficiente para translocar proteínas a los cloroplastos *in vivo* (Bionda *et al.*, 2010). Sin embargo, para poder realmente demostrar la funcionalidad de cada uno de los transcritos editados sería necesario corroborar que se traducen y sus productos se trasladan al cloroplasto. Esto podría realizarse mediante Western blots, separando las fracciones celulares, esperando ver en la fracción cloroplástica una mayor acumulación de las proteínas ClpP1 y RpoA, ya que ambos transgenes se expresan a niveles altos debido al uso del promotor fuerte 35S.

La caracterización molecular de las líneas transgénicas apoya la idea de que las construcciones no son funcionales. Esto en base, a que primero, la actividad del complejo proteasa Clp parece estar igualmente afectada que en la mutante *clb19*, ya que se observa acumulación de la enzima DXS, que debiera de ser degradada, directa o

indirectamente, por la proteasa (**Figura 20**). Segundo, la actividad de la PEP tampoco parece ser mejor en las líneas transgénicas, ya que en estas plantas se siguen acumulando transcritos mal procesados en un patrón casi idéntico a la mutante *clb19* (**Figura 21**).

Otra explicación de que las construcciones no son funcionales, es que en ambos casos las proteínas de interés son parte de complejos multiproteicos. Por lo tanto, podría ser que las versiones editadas, al estar bajo el control de un promotor constitutivo como es el 35S, produzcan un exceso de proteína de forma no regulada. Al ser Clp y PEP complejos multiprotéicos, sumamente regulados, un desbalance de la proporción de subunidades podría estar afectando el correcto ensamblaje y estructura general de los complejos, por lo tanto tendrían una funcionalidad comprometida. Existen casos similares reportado, por ejemplo, se ha observado que sobre-expresando una subunidad RPN5la del proteosoma 26S, que es otro complejo multiprotéico, a partir del promotor 35S, se producen cantidades excesivas de dicha proteína que afectan la actividad e integridad del proteosoma. Esta sobre-expresión da como resultado un fenotipo de floración prematura (Book *et al.*, 2009). Otro ejemplo, cercanamente relacionado, es de la subunidad ClpP4 de la proteasa Clp. Cuando se sobreexpresa ClpP4, se observó un fenotipo clorótico en las plantas causado por el incremento de los niveles de la proteína. Analizando estas plantas transgénicas a detalle se observó que no existían cloroplastos funcionales. Esto apoya una vez más la idea que las subunidades proteolíticas de Clp se requieren en cierta proporción y la sobreproducción o baja producción de alguna de ellas puede afectar la estructura general del complejo. Existe evidencia que sugiere que hay competencia directa entre las subunidades proteolíticas durante o para la formación del complejo (Shen *et al.*, 2007). En cuanto a la PEP, no existen reportes de sobreexpresión de alguna de sus subunidades, pero al ser también un complejo multiprotéico se puede hipotetizar que la sobreproducción de alguna subunidad también podría interrumpir con el correcto ensamblaje y función de la polimerasa. Sin embargo, estas posibilidades tendrían que ser analizadas con más cuidado.

Tal vez una estrategia más eficaz, para separar los fenotipos causados por la no edición del transcrito de *clpP1* y *rpoA*, sería la transformación directa de cloroplastos (Maliga, 2004) con las versiones editadas para *clpP1* o *rpoA* y bajo su promotor natural de cada gen. En este caso, se transformarían cloroplastos en plantas heterocigas para la mutación *clb19*. De esta forma nos aseguraríamos de no interrumpir con la formación natural de los complejos y que la proteína estará en cloroplasto. De esta manera, podremos analizar por separado los fenotipos que causa la no edición de cada uno de los transcritos. Sin descartar la idea que la proteína CLB19 pudiera tener otra función aparte de la de participar en el proceso de edición de *rpoA* y *clpP1*.

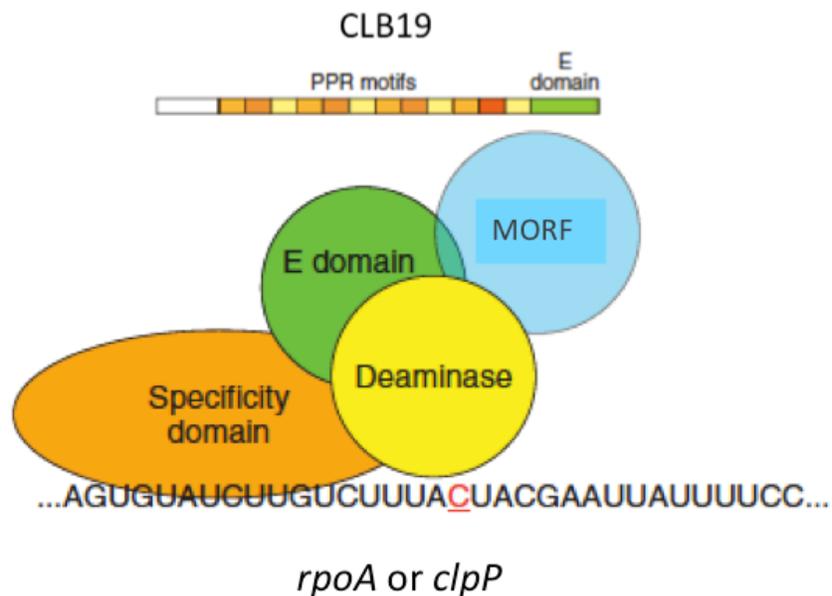
Hasta ahora, el modelo actual de la edición en plantas propone que la maquinaria de edición comprende un elemento en *cis* cerca de la C a editar, reconocido por un factor de especificidad que recluta a una enzima desconocida, que realiza la edición. La evidencia experimental apunta a que las proteína PPR se unen a uno o varios blancos de RNA en la región -25/+10 con respecto a la citidina a editar (Chateigner-Boutin y Small, 2011). Por primera vez, la unión a esta región fue confirmada con la proteína CRR4 (Okuda et al., 2006) y más recientemente con proteínas como OTP82 y CRR22 (Okuda y Shikanai, 2012). Recientemente, en el grupo de trabajo, se ha confirmado con la proteína CLB19 completa y la versión trucada de los dominios E (Ramos, No publicado). Por lo tanto, las PPR son los factores en *trans*, que dan especificidad al proceso de edición.

Algunas proteínas como CLB19, CRR22, CRR28, OTP82 (Revisado en Hammani *et al.*, 2009) tienen más de un blanco de edición esto podría deberse a que existe un consenso ambiguo entre los blancos, que reconocen estas PPRs. Aunque en algunos casos el consenso no se puede encontrar, otra opción es que los distintos arreglos de motivos PPR dentro de la misma proteína reconocen distintos sitios blanco, permitiendo a la proteína unirse a distintos sitios blancos no relacionados en secuencia (Hammani *et al.*, 2009).

Recientemente, se ha identificado la familia de proteínas MORF (Multiple Organellar RNA Editing Factor) las cuales son componentes adicionales en la maquinaria de edición en organelos de plantas e interactúan selectivamente con proteínas PPR para formar el editosoma. En plástidos dos proteínas MORF (MORF2 y MORF9) son requeridas para la edición completa en casi todos los sitios de edición probablemente actuando como un complejo heterodimérico (Takenaka, *et al.*, 2012).

Otro de los objetivos, del presente trabajo, consistió en analizar si la proteína CLB19 deletada de los dominios EE+ es capaz de unirse a sus blancos y si lo hace si es una unión específica *in vitro*. Para dicho propósito fue necesario expresar a la proteína truncada y aislar suficiente cantidad de proteína, para hacer ensayos EMSA. Un método conveniente para este para la realización de este objetivo fue mediante la expresión de proteínas heterólogas en bacterias, que portan una secuencia específica para su purificación (Sandber y Mulroney, 2002). Parte de este trabajo, consistió en encontrar las condiciones que permitieran obtener una sobre-expresión de dicha proteína. A pesar de varios intentos de purificación, sólo se logró obtener una purificación parcial de la proteína CLB19  $\Delta$ EE+ (**Figura 25a**). Esto parece deberse a que algunas proteínas no abanderadas, con el epítotope de Histidinas, interactuaron con la resina de Ni-NTA, durante la purificación nativa. Sin embargo, ya está demostrado que proteínas recombinantes expresadas en *E. coli* parcialmente purificadas y hasta extractos proteicos totales, pueden ser usados para en ensayos EMSA o de UV cross-linking con el objetivo de examinar la unión específica entre proteína-DNA o proteína-RNA (Sandber y Mulroney, 2002; Heaton *et al.*, 2001; Laniel *et al.*, 2001; Murakami *et al.*, 1996). Por lo que se decidió que la purificación parcial era suficiente para usarla en ensayos EMSA. Para asegurarse de la especificidad entre la interacción DNA-proteínas o RNA-proteína, se deben usar competidores no específicos. Esto es particularmente importante cuando se usan extractos totales de proteínas o en purificaciones parciales, que contienen otras proteínas, además para evitar uniones no específicas que interfieran con el EMSA, se puede usar DNA o RNA sintético (Laniel *et al.*, 2001). Basado en lo anterior, dicha proteína actualmente, en otro trabajo, ya ha sido usada en ensayos EMSAs y los resultados indican que existen unión específica entre la proteína

CLB19  $\Delta$ EE+ y sus blancos (Ramos-Vega, no publicado), tal y como sucede con la proteína CRR4  $\Delta$ EE+ (Okuda *et al.*, 2007), OTP82 y CRR22 (Okuda y Shikanai, 2012). Por lo que se apoya la idea que los dominios PPR por si solos son suficientes y necesarios para la unión a sus blancos. Estos datos están apoyando lo que se había reportado en estas otras proteínas con dominio E y E+ sugiriendo que los motivos PPR de CLB19 son capaces de reconocer dos secuencias de RNA (*rpoA* y *clpP*) probablemente gracias a un consenso ambiguo entre ambas secuencias o que los distintos arreglos de motivos PPR permite a CLB19 unirse a dos blancos. En general, se puede proponer que los motivos PPR son el factor de especificidad de unión al RNA, y las proteínas MORF se unen a las PPR a través de los dominios E o el DYW y probablemente también a la enzima desaminasa no descubierta, formando el editosoma (**Figura 26**).



**Figura 26.** Modelo propuesto. CLB19 funciona como factor de especificidad, reconoce tanto *rpoA* y *clpP*. El dominio E es absolutamente requerido para la edición ya que probablemente recluta una enzima desaminasa desconocida que lleva a cabo la desaminación de la citidina. Modificado de Chateigner-Boutin y Small, 2012.

## 8. APÉNDICE

### Buffer de carga DNA

Azul de bromofenol	25%
Xilen cianol	25%
Glicerol	50%

### Buffer CTAB 2X

Tris HCl pH 8	100 mM
NaCl	1.4 M
EDTA	20 mM
CTAB (bromuro de cetil-metil-amonio)	2%
Agua destilada	

### Buffer de transferencia proteínas

Tris HCl pH 8.8	6 g
Glicina	28.8 g
Metanol	400 ml
Agua destilada	cbp 2 L

### Buffer de lisis (1L)

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	10 mM
Ajustar pH a 8.0 con NaOH	

### Buffer de lavado (1L)

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	20 mM
Ajustar pH a 8.0 con NaOH	

### Buffer de elución (1L)

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	250 mM
Ajustar pH a 8.0 con NaOH	

### 5x buffer de carga para RNA

Azul de bromofenol saturado	16 µl
EDTA 500 mM pH 8	80 µl
Formaldehído 37%	720 µl
Glicerol 100%	2 µl
Formamida	3.084 ml
10X FA gel buffer	4 µl
Agua destilada estéril cbp	10 ml

**10X FA gel buffer**

MOPS	200 nM
Acetato de Sodio	50 mM
EDTA	10 mM
Ajustar a pH 7 con NaOH	
Esterilizar en autoclave	

**1X FA buffer de corrida**

10X FA gel buffer	100 ml
Formaldehído 37%	20 ml
Agua destilada estéril	880 ml

**Gel de poliacrilamida 10% (10ml)**

Mezcla de acrilamida 30%	3.3 ml
Tris/Glicina 1.5 M (pH 8.8)	1.3 ml
SDS 10%	0.05 ml
Persulfato de sodio 10%	0.05 ml
TEMED (Tetrametil Etil N-Diamina)	0.02 ml
Agua destilada	

**Gel concentrador para gel de poliacrilamida (2ml)**

Mezcla de acrilamida 30%	0.33 ml
Tris/Glicina 1 M (pH 6.8)	0.25 ml
SDS 10%	0.02 ml
Persulfato de sodio 10%	0.02 ml
TEMED	0.001 ml
Agua destilada	

**Medio de crecimiento GM sólido**

Sales de MS	0.431 g
Sacarosa	0.5 g
Mes	0.05 g
Vitamina B5	0.1 ml
H <sub>2</sub> O	cbp 1 L

**Medio LB (Luria-Bertani) líquido (1 L)**

Peptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
Cloruro de sodio	10 g
Agua destilada	cbp 1 L

**Medio LB sólido (1L)**

Peptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
Cloruro de sodio	10 g

Agar	15 g
Agua destilada	

**Mezcla de acrilamida 30%**

Acrilamida	29.2%
N,N'-metilen-bis-acrilamida	0.8%
Agua destilada	

**PBS 10X**

NaCl	80 g
KCl	2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14.4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.4 g

Aforar a 1 L con agua destilada  
Ajustar pH a 7.4 con HCl, esterilizar

**Ponceau's**

Ponceau's	0.2%
Ácido acético	1%
Agua destilada	

**Solución de prehibridación**

Buffer de fosfatos 1 M pH 7.2	52 ml
SDS 20%	35 ml
EDTA 0.5 M pH 8	102.5 µl

Llevar a 100ml con agua destilada  
Adicionar 1 g de BSA fracción V  
Alicuotar en fracciones de 20ml

**Solución de lavado para Western blot**

Tween 20	0.1%
NaCl	0.5 mM
PBS	1X

**TAE (1X)**

Tris-Acetato pH 8.0	40 mM
EDTA 0.1	1 mM

## 9. LITERATURA CITADA

- Adam, Z., Adamska, I., Nakabayashi, K., Ostersetzer, O., Haussuhl, K., Manuell, A., Zheng, B., Vallon, O., Rodermel, S.R., Shinozaki, K., and Clarke, A.K. (2001). Chloroplast and mitochondrial proteases in *Arabidopsis*: A proposed nomenclature. *Plant Physiol.* 125: 1912–1918.
- Adam, Z., Rudella, A., and van Wijk, K.J. (2006). Recent advances in the study of Clp, FtsH and other proteases located in chloroplasts. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9: 234–240.
- Allison L. (2000). The role of sigma factors in plastid transcription. *Biochimie* 82: 537–548.
- Anamaru, K. K., and Anaka, K. T. (2004). Roles of Chloroplast RNA Polymerase Sigma Factors in Chloroplast Development and Stress Response in Higher Plants I . RNA Polymerases for Chloroplast Tran- III . Positive Control of Plastid Gene Ex- *Plant Cell*, 68(11): 2215-2223.
- Aubourg, S., N. Boudet, M. Kreis, and A. Lechary. (2000) *Arabidopsis thaliana*, 1% of the genome codes for a novel protein family unique to plants. *Plant Mol. Biol.* 42: 603-613.
- Barkan, A. and Goldschmidt-Clermont, M. (2000). Participation of nuclear genes in chloroplast gene expression. *Biochimie*, 82(6-7): 559-72.
- Benne R., van den Burg J., Brakenhoff J.P.J., Sloof P., van Boom J.H., and Tromp M.C. (1986). Major transcript from the frameshifted *coxII* gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA, *Cell* 46: 819–826.
- Bionda, T., Tillmann, B., Simm, S., Beilstein, K., Ruprecht, M., and Schleiff, E. (2010). Chloroplast import signals: the length requirement for translocation in vitro and in vivo. *Journal of molecular biology*, 402(3), 510-23.
- Bock, R. (2000). Sense from nonsense: how the genetic information of chloroplasts is altered by RNA editing. *Biochimie*, 82(6-7): 549-57.
- Book, A. J., Smalle, J., Lee, K.-H., Yang, P., Walker, J. M., Casper, S., Holmes, J. H., et al. (2009). The RPN5 subunit of the 26s proteasome is essential for gametogenesis, sporophyte development, and complex assembly in *Arabidopsis*. *The Plant cell*, 21(2), 460-78.
- Bradfordn M. (1976). A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248.
- Chateigner-Boutin A, Colas des Francs-Small C, Delannoy E, Kahlau S, Tanz S, Falcon de Longevialle A, Fujii S, and Small I. (2011). OTP70 is a pentatricopeptide repeat protein of the E subgroup involved in splicing of the plastid transcript *rpoC1*. *Plant Journal* 65: 532–542.
- Chateigner-Boutin, A.-L., and Small, I. (2011). Organellar RNA editing. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA.* 2(4). 493-506.
- Chateigner-Boutin, A.-L., Ramos-Vega, M., Guevara-García, A., Andrés, C., de la Luz Gutiérrez-Nava, M., Cantero, A., Delannoy, E., et al. (2008). CLB19, a pentatricopeptide repeat protein required for editing of *rpoA* and *clpP* chloroplast transcripts. *The Plant journal*, 56(4): 590-602.

- Danon, A. (1997). Translational Regulation in the Chloroplast. *Cell*, 115(4): 1293-1298.
- Das, K., P.T.W. Cohen, and D. Barford. (1998). The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions. *EMBO J.* 17: 1192-1199.
- Doniwa Y, Ueda M, Ueta M, Wada A, Kadowaki K, and Tsutsumi N. (2010). The involvement of a PPR protein of the P subfamily in partial RNA editing of an Arabidopsis mitochondrial transcript. *Gene* 454: 39–46.
- Fujii, S., and Small, I. (2011). The evolution of RNA editing and pentatricopeptide repeat genes. *The New Phytologist*. 191(1): 37-47.
- Gutiérrez-Nava, M.L., Gillmor, C.S., Jiménez, L.F., Guevara-García, A. and León, P. (2004) CHLOROPLAST BIOGENESIS genes act cell and noncell autonomously in early chloroplast development. *Plant Physiol.* 135: 471–482.
- Hammani, K., Okuda, K., Tanz, S. K., Chateigner-Boutin, A.-L., Shikanai, T., and Small, I. (2009). A study of new Arabidopsis chloroplast RNA editing mutants reveals general features of editing factors and their target sites. *The Plant Cell*, 21(11): 3686-99.
- Heaton, J.H., Dlakic, W.M. Dlakic, M., and Gelehrter, T.D. (2001). Identification and cDNA cloning of a novel RNA-binding protein that interacts with the cyclic nucleotide-responsive sequence in the type-1 plasminogen activator inhibitor mRNA. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(2), 3341-3347.
- Kimura, M., Fujita, N. and Ishihama, A. (1994) Functional map of the alpha subunit of Escherichia coli RNA polymerase. Deletion analysis of the amino-terminal assembly domain. *J. Mol. Biol.* 242: 107–115.
- Kotera E, Tasaka M, and Shikanai T. (2005). A pentatricopeptide repeat protein is essential for RNA editing in chloroplasts. *Nature* 433: 326–330.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.
- Laniel, M., Béliveau, A. and Guérin, S.L: (2001). Electrophoretic Mobility Shift Assays for the Analysis of DNA-Protein Interactions. *DNA-protein Interactions, Methods in Molecular Biology*. 148, 13-30.
- León, P. and Guevara-García, A. (2008). El cloroplasto: un organelo clave en la vida y en el aprovechamiento de las plantas. En: López-Munguía, A. Una ventana al que hacer científico, Instituto de Biotecnología de la UNAM 25 Aniversario, cap 20. México, D.F. UNAM. Pp. 215-230.
- López-Juez, E. and Pyke, K. A. (2005). Plastids unleashed : their development and their integration in plant development. *Int. J. Dev. Biol.* 49: 557-577.
- Lurin, C. André's, S. Aubourg, M. Bellaoui, F. Bitton, C. Bruye`re, M. Caboche, C. Debast, J. Gualberto, B. Hoffmann, A. Lecharny, M.L. Ret, M.-L. Martin-Magniette, H. Mireau, N. Peeters, J.-P. Renou, B. Szurek, L. Taconnat, and I. Small. (2004). Genome-wide analysis of Arabidopsis pentatricopeptide repeat (PPR) proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *Plant Cell* 16: 2089-2103.
- Maliga, P. (2004). Plastid transformation in higher plants. *Annual review of plant biology*. 55, 289-313.
- Murakami, Y., Huberman, J. A., and Hurwitz, J. (1996) Identification, purification, and molecular cloning of autonomously replicating sequence-binding protein 1 from

- fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 502–507.
- Okuda K, Chateigner-Boutin AL, Nakamura T, Delannoy E, Sugita M, Myouga F, Motohashi R, Shinozaki K, Small I, and Shikanai T. (2009). Pentatricopeptide repeat proteins with the DYW motif have distinct molecular functions in RNA editing and RNA cleavage in *Arabidopsis* chloroplasts. *Plant Cell* 21: 146–156.
- Okuda, K., and Shikanai, T. (2012). A pentatricopeptide repeat protein acts as a site-specificity factor at multiple RNA editing sites with unrelated cis-acting elements in plastids. *Nucleic acids research*, 4(18), 1-13.
- Okuda, K., Chateigner-Boutin, A.-L., Nakamura, T., Delannoy, E., Sugita, M., Myouga, F., Motohashi, R., et al. (2009). Pentatricopeptide repeat proteins with the DYW motif have distinct molecular functions in RNA editing and RNA cleavage in *Arabidopsis* chloroplasts. *The Plant cell*, 21(1): 146-56.
- Okuda, K., Myouga, F., Motohashi, R., Shinozaki, K., and Shikanai, T. (2007). Conserved domain structure of pentatricopeptide repeat proteins involved in chloroplast RNA editing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104(19): 8178-83.
- Peltier, J.B., Ripoll, D.R., Friso, G., Rudella, A., Cai, Y., Ytterberg, J., Giacomelli, L., Pillardy, J., and van Wijk, K.J. (2004). Clp protease complexes from photosynthetic and non-photosynthetic plastids and mitochondria of plants, their predicted three-dimensional structures, and functional implications. *J. Biol. Chem.* 279: 4768- 4781.
- Pogson, B. J., and Albrecht, V. (2011). Genetic dissection of chloroplast biogenesis and development: an overview. *Plant physiology*, 155(4): 1545-51.
- Rajasekhar V.K., and Mulligan R.M. (1993). RNA editing in plant mitochondria:  $\alpha$ -phosphate is retained during C-to-U conversion in mRNAs. *Plant Cell* 5:1843–1852.
- Raven, P.H., Evert, R.F. and Eichhorn, S.H. (2003). *Biology of Plants*. W.H. Freeman and Company Worth Publishers, Nueva York.
- Rivals, E., C. Bruyere, C. Toffano-Nioche, and A. Lecharny. (2006). Formation of the *Arabidopsis* pentatricopeptide repeat family. *Plant Physiol.* 141: 825-839.
- Rudella, A., Friso, G., Alonso, J.M., Ecker, J.R. and van Wijk, K.J. (2006) Downregulation of ClpR2 leads to reduced accumulation of the ClpPRS protease complex and defects in chloroplast biogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 18: 1704–1721.
- Saha, D., Prasad, a M., and Srinivasan, R. (2007). Pentatricopeptide repeat proteins and their emerging roles in plants. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Société française de physiologie végétale*, 45(8): 521-34.
- Sakamoto, W. (2006). Protein degradation machineries in plastids. *Annual review of plant biology*, 57: 599-621.
- Sakamoto, W., Miyagishima and Jarvis, P. (2008). Chloroplast Biogenesis: Control of Plastid Development, Protein Import, Division and Inheritance. *The Arabidopsis Book*. 62(1): 1.
- Sandberg, K. and Mulroney, S.E. 2002. RNA binding proteins: new concepts in gene regulation. Kluwer Academic Publishers. Pp 236.

- Serino, G., and Maliga, P. (1998). RNA polymerase subunits encoded by the plastid *rpo* genes are not shared with the nucleus-encoded plastid enzyme. *Plant physiology*, 117(4), 1165-70.
- Shen, G., Yan, J., Pasapula, V., Luo, J., He, C., Clarke, A. K., and Zhang, H. (2007). The chloroplast protease subunit ClpP4 is a substrate of the E3 ligase AtCHIP and plays an important role in chloroplast function. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 49(2), 228-37.
- Shiina, T., Tsunoyama, Y., Nakahira, Y., and Khan, M.S. (2005). Plastid RNA polymerases, promoters, and transcription regulators in higher plants. *Int. Rev. Cytol.* 244: 1-68.
- Sjögren, L. L. E., Stanne, T. M., Zheng, B., Sutinen, S., and Clarke, A. K. (2006). Structural and functional insights into the chloroplast ATP-dependent Clp protease in *Arabidopsis*. *The Plant cell*, 18(10): 2635-49.
- Small I. D. and Peeters, N. (2000). The PPR motif - a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins, *Trends Biochem. Sci.* 25: 46-47.
- Stern, D. B., Goldschmidt-Clermont, M., and Hanson, M. R. (2010). Chloroplast RNA metabolism. *Annual review of plant biology*, 61: 125-55.
- Takenaka, M., Zehrmann, A., Verbitskiy, D., Kugelmann, M., Härtel, B., and Brennicke, A. (2012). Multiple organellar RNA editing factor (MORF) family proteins are required for RNA editing in mitochondria and plastids of plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(13): 5104-5109.
- Vothknecht, U.C. and Westhoff, P. (2001) Biogenesis and origin of thylakoid membranes. *Biochem. Biophys. Acta*, 1541: 91–101.
- Wang, J., Hartling, J. A., and Flanagan, J. M. (1997). Resolution The Structure of ClpP at 2.3 Å Suggests a Model for ATP-Dependent Proteolysis. *Cell*, 91: 447-456.
- Waters, M. T., and Langdale, J. A. (2009). The making of a chloroplast. *The EMBO journal*, 28(19): 2861-73.
- Yu W., and Schuster W. (1995). Evidence for a site-specific cytidine deamination reaction involved in C to U RNA editing of plant mitochondria, *J. Biol. Chem.* 270: 18227–18233.