



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

EFFECTO DE LAS AUXINAS SOBRE EL PROCESO DE  
TRADUCCIÓN EN MAÍZ: MODULACIÓN A NIVEL  
RIBOSOMAL.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS  
P R E S E N T A :  
JORGE RAFAEL IBARRA CABALLERO

México, D. F.

1990

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

00562<sup>2</sup>29



## **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 está 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.

## Resumen

Las auxinas son un grupo de fitorreguladores que provocan numerosas respuestas al ser aplicadas a tejidos vegetales. Estas respuestas incluyen eventos a nivel transcripcional y postranscripcional. En nuestro laboratorio se ha observado que la aplicación exógena de auxinas a ejes embrionarios de maíz provoca cambios en la fosforilación de los ribosomas, y simultáneamente produce cambios en el patrón electroforético de proteínas sintetizadas in vivo. En tejidos animales se ha reportado que la fosforilación de proteínas ribosomales altera la funcionalidad de los ribosomas. Por estos antecedentes, en el presente trabajo se propone que las auxinas alteran la selectividad de los ribosomas produciendo la traducción diferencial de RNAs mensajeros. Esta hipótesis se sometió a prueba desarrollando un sistema heterólogo de traducción in vitro, y utilizando 4 RNAs mensajeros naturales, así como una auxina sintética (MCPFP) y la auxina natural (AIA). Los resultados obtenidos indican que ambas auxinas, al ser aplicadas a ejes embrionarios de maíz, cambian la selectividad de los ribosomas, y producen una mayor protección de los RNA mensajeros en los polisomas. Ambos efectos son muy claros con el MCPFP, y en menor medida con el AIA.

## Abstract

### "Auxin effect on translation process in maize: modulation at the ribosomal level"

Auxins are a group of plant hormones that cause a number of responses when applied to plant tissues. Transcriptional and postranscriptional events are included among these responses. In our laboratory we have observed that exogenous application of auxin to maize embryo-axes modifies ribosomal phosphorylation, and simultaneously changes the electrophoretic map of the in vivo synthesized proteins, as it have been reported in animal tissues. Based upon the above mentioned, we suggest in this work that auxins modifies ribosomal selectivity, producing a differential translation of messengers RNAs. This hypothesis has been tested creating a heterologous in vitro translation system with 4 natural messenger RNAs, one synthetic auxin (MCPP) and the natural auxin (AIA). It was found that both auxins change ribosomal selectivity and confers a great protection to messenger RNAs attached in polysomes, when applied to maize embryo-axes. The two above effects are very conspicuous by using MCPP and in a minor extent with AIA.

Reporte de Tesis de Maestría.

Efecto de las auxinas sobre el proceso de traducción en maíz:  
modulación a nivel ribosomal.

I. Antecedentes.

1. Germinación en cereales: eventos embrionarios.
2. Auxinas.
3. Síntesis de proteínas (traducción) y su control.

II. Introducción.

1. Trabajo efectuado en el laboratorio.
2. Planteamiento del problema y metas propuestas.

III. Diseño experimental.

IV. Metodologías.

V. Resultados.

VI. Discusión. Trabajo a futuro.

VII. Conclusiones. Trabajo a futuro.

VIII. Referencias.

## Antecedentes

### 1. Germinación en cereales: eventos embrionarios

"Germinación" es un término no definido con precisión, ni siquiera de manera convencional. Para algunos fisiólogos de vegetales significa un proceso, el cual incluiría la hidratación de la semilla, el reestablecimiento de la actividad metabólica, la elongación de la radícula y su emergencia a través de la cubierta de la semilla e incluso "el subsecuente crecimiento de la plántula" (Salisbury y Ross, 1978. pp 322-323). Otros investigadores limitan el concepto de germinación hasta la emergencia de la radícula; o bien hasta el inicio de su elongación (sin incluirla ya) (Bewley y Black, 1986. pp 1-2). Es también común que se refiera a la germinación como un evento: la emergencia de la radícula; o aún como la emergencia de la plántula sobre el suelo, esto sobre todo en el ámbito agrícola.

Aunque Bewley y Black (1986, pp 1-2) señalan como fin de la germinación el inicio de la elongación de la radícula, también indican que el evento que podemos detectar visual y fácilmente es su emergencia. Esto es porque la elongación inicial se da dentro de la semilla, bajo la cubierta de ésta.

Debido a lo anterior, en este trabajo se considerará a la germinación como todos los eventos (un proceso) que ocurren desde que se pone a imbibir la semilla hasta que puede observarse la emergencia de la radícula. Por supuesto, esta definición excluye a aquellas semillas que no requieren en su maduración de un peri-

odo de deshidratación hasta llegar a un estado de bajo contenido de agua.

En los diferentes grupos de plantas (p.ej. monocotiledóneas, dicotiledóneas) la germinación puede tener aspectos peculiares. La estructura de la semilla misma difiere marcadamente de un grupo a otro. Por tanto, aquí sólo se describirá brevemente el proceso de germinación de los cereales (Gramineae=Poaceae), familia a la cual pertenece el maíz (*Zea mays* L.).

En los cereales, cada semilla no solo es una semilla sino un fruto completo llamado cariopsis. Una cariopsis es un fruto seco indehiscente en el cual se hallan fusionadas las paredes del fruto y de la semilla; este fruto contiene un unico embrión, rodeado de endospermo (tejido de reserva) (Strasburger, et al., 1974. pp 249 ). El embrión está formado por el eje embrionario y por el cotiledón, modificado este último para formar el escutelo. En el maíz y otras gramíneas, el eje embrionario puede dividirse en coleoptilo, mesocotilo (al cual está unido el escutelo), y radícula.

La germinación se inicia cuando la semilla se coloca en un sustrato del cual pueda tomar agua. Las semillas maduras contienen solo alrededor de 15% de humedad, y en presencia de agua se rehidratan rápidamente. Durante esta imbibición, las proteínas, carbohidratos, y demás macromoléculas readquieren la estructura que tienen en células con un contenido alto de humedad (mayor a 90%). Por ejemplo, las membranas pueden no estar completamente estructuradas, por lo cual al iniciarse la imbibición salen de la

célula algunos solutos pequeños (Bewley y Black, 1986. pp 120-123. Simon, 1984. pp 82-90). Pronto, sin embargo, las membranas retornan a su configuración normal.

Después de iniciarse la imbibición de los tejidos embrionarios, se reinician las actividades normales de las células, junto con aquellas involucradas directamente en la germinación. Ellas llevarán a la protusión de la radícula y al posterior establecimiento de la plántula.

En esta etapa, el metabolismo del eje embrionario difiere notablemente de lo que ocurre en el resto de la semilla (por ejemplo, en la aleurona, el escutelo, etc.). En este trabajo sólo se tratará lo relacionado con los fenómenos que ocurren en el eje embrionario (aunque en ocasiones haga mención del "embrión").

Metabolismo embrionario. Una parte importante de las actividades metabólicas que se reinician en el embrión durante la germinación requieren necesariamente la producción de ATP. A pesar de que en las células del embrión "seco" las mitocondrias tienen muy poca diferenciación interna, muy pronto después del inicio de la imbibición pueden reasumir su actividad respiratoria (Simon, 1984. pp 95-101). Durante la germinación, no se incrementa la poza total de ATP, pero se sintetiza tanto como va siendo utilizado. Por su parte, los reductores NADH y NADPH se producen en la glucólisis y en la vía de las pentosas, respectivamente, como ocurre en las células hidratadas.

La síntesis de proteínas es esencial para que se complete la

germinación y para que emerja la radícula (Bewley y Black, 1986. p. 156-171). La biosíntesis de proteínas en germen de trigo es uno de los primeros procesos biológicos activados cuando se inicia la imbibición (Seal et al., 1977. p. 167). Aunque aparentemente no hay polisomas formados en el embrión "seco" (al menos en trigo; y en maíz, Sánchez de Jiménez, Aguilar y Lopez, 1981), a los 10-15 minutos de imbibición la cantidad de polisomas comienza a incrementarse rápidamente (Marcus, Feeley y Volcany, 1966). En trigo así como en otras especies de cereales, se han obtenido de los embriones secos muchos de los componentes de la maquinaria de síntesis de proteínas (Bewley y Black, 1986. p. 159). Más aún, múltiples reportes indican que existe RNA mensajero traducible en el embrión seco, y que este RNA mensajero es capaz de mantener la síntesis de proteínas durante varias horas en ausencia de síntesis de nuevo RNA (Sánchez de J. y Aguilar, 1984). Lo que aún es materia de controversia es si entre estos mensajeros (del embrión) hay algunos que sean indispensables para la germinación (lo cual significaría que hay proteínas indispensables para la germinación en sí) (Dure III y Harris, 1977. pp. 279-292; Sánchez-Martínez, Puigdomènech y Pagés, 1986) o si son mensajeros en este sentido iguales a los que se sintetizan posteriormente durante la germinación. Antes de que se complete la germinación, la síntesis de proteínas se hace dependiente de la síntesis de nuevo RNA, aunque esto varía de una especie a otra.

En germen de trigo se ha detectado también síntesis de RNA ribosomal a partir de la segunda hora de imbibición, y es de

inmediato incorporado en ribosomas (Huang, et al., 1980). Asimismo, a pesar de que existen RNA de transferencia y aminoacil-tRNA sintetasas en el eje seco, ocurre síntesis de tRNA también a tiempos muy tempranos después del inicio de la imbibición (Walbot, 1972). Parece entonces que la maquinaria completa de síntesis de proteínas está lista para funcionar desde casi el inicio de la germinación. Sobre la regulación de esta actividad se tratará más adelante.

#### Participación de los reguladores de crecimiento.

Los reguladores de crecimiento han sido sobre todo estudiados en embriones en desarrollo y en tiempos posteriores a lo correspondiente a nuestra definición de germinación.

Las giberelinas y citocininas incrementan notablemente su nivel durante el desarrollo del embrión hasta alcanzar un máximo y posteriormente bajan hasta los niveles iniciales cuando la semilla alcanza su maduración; ello puede ocurrir por degradación o por formación de conjugados inactivos (Bewley y Black, 1986. p 76-84). El ácido abscísico por el contrario se incrementa al final del proceso de maduración.

Las auxinas siguen el mismo comportamiento que los dos primeros fitorreguladores. En maíz durante el desarrollo del embrión, la mayoría del ácido indolacético (AIA) es convertido en formas conjugadas, por ejemplo: AIA-arabinósido, AIA-mioinositol, y AIA-mioinositol-arabinósido. Según Bewley y Black (1986, pp 76-78) estos compuestos son hidrolizados después de la germinación,

liberando la auxina y permitiendo su transporte al coleoptilo: "... no hay evidencia de que el AIA participe en el proceso de la germinación o en la emergencia de la radícula, pero eventos posteriores..." pueden estar controlados por la auxina.

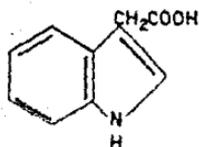
En este trabajo se presentan algunas evidencias del efecto de las auxinas durante la germinación. Por ello, en el siguiente apartado se tratará con mayor detalle a estos fitorreguladores.

## 2. Auxinas.

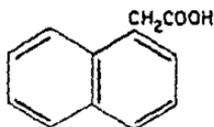
Las auxinas son un grupo de sustancias, incluyendo naturales y sintéticas, que comparten algunas características estructurales, pero sobre todo, producen en ciertos bioensayos respuestas similares a las que produce la auxina natural: el ácido indolacético (Guilfoyle, 1986. p 247). Esta definición puede parecer circular, pero ello se debe a que aun no conocemos los rasgos esenciales de su mecanismo de acción; y peor aun, todavía no sabemos cuáles de todas las respuestas que producen las auxinas son respuestas primarias (debidas directamente a ellas) o si se trata de consecuencias posteriores de algún evento primario (Guilfoyle, 1986. pp 263,270).

En la figura se muestra la estructura del AIA, considerado por muchos como la única auxina natural. El ácido fenilacético ocurre en muchas plantas, aunque es menos activo que el AIA y se ignora si normalmente funciona como "auxina" (Salisbury y Ross, 1978 p. 240-247). También se muestran aquí algunas de las "auxinas" sintéticas, las más conocidas y utilizadas (Bidwell, 1974;

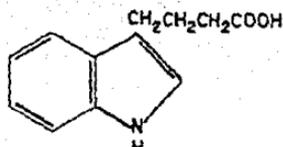
Bevan y Northcote, 1981; Hagen, Kleinschmidt y Guilfoyle, 1984).



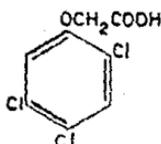
AIA



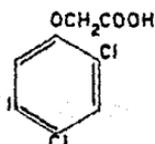
ANA



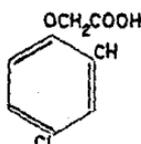
AIB



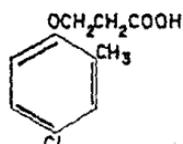
2,4,5-T



2,4-D



MCPA



MCPP

La respuesta por la cual se descubrió el AIA y que se utiliza frecuentemente como ensayo de "actividad de auxina", es la de la curvatura del coleoptilo. En este ensayo se aplica el extracto con auxina o la solución de auxina en un lado de un coleoptilo decapitado de Avena. La presencia de auxina causa que se curve el coleoptilo en dirección opuesta a la de la aplicación, por la elongación de los tejidos donde se aplicó la auxina. Este bioensayo es "específico para auxinas".

Otro bioensayo muy parecido al anterior es la prueba de elongación. Para ella se cortan secciones del coleoptilo o de tallos jóvenes de cereal, y se colocan en solución de sacarosa con el extracto con auxina. La elongación que se produce respecto al control se considera causada por la auxina, aunque el ácido

giberélico, protones, el potasio y la fucosina también pueden provocar esta elongación. Junto con este efecto (la elongación celular), la aplicación exógena de auxinas es capaz de inducir otras muchas respuestas. Zeroni y Hall (1980, pp. 511-586) enlistan 21 "efectos de auxinas en procesos celulares", dividiéndolos en "efectos en el metabolismo", incrementos de actividad enzimática, "electrofisiología", crecimiento y extensibilidad, y secreción de proteínas. En realidad, quizás algunos de los efectos sean indirectos; aunque también algunos de ellos (como "estimulación de la respiración") podrían dividirse de manera más detallada en diversos eventos bioquímicos. De cualquier manera, esta lista da idea de la variedad de respuestas que ocasionan las auxinas. La estimulación del crecimiento ocasionado por la aplicación exógena de auxinas se observa después de un corto periodo de latencia (6-15 minutos). Por ello y por otras observaciones, se pensó que el o los efectos primarios de la auxina deben ocurrir durante este periodo. Pronto fue aparente para muchos investigadores que la auxina "debilitaba" de alguna manera a las paredes celulares, permitiendo la elongación de las células (conducida físicamente por la presión de turgencia) (Moore, 1979, p 64). Un gran número de hipótesis han sido propuestas para dar cuenta de este debilitamiento. Inicialmente se pensó en un efecto de la auxina misma directamente sobre la pared celular; por ejemplo, se propuso que el AIA quelaba iones calcio, permitiendo que componentes de la pared que se mantenían unidos por enlaces iónicos mediados por calcio, se "deslizaran" entre sí. Esta hipótesis

fue rechazada al comprobarse que la distribución de calcio en la pared no se ve afectada por la auxina (Cleland y Rayle, 1977).

Desde mediados de los sesentas se han establecido dos corrientes en la investigación sobre el sitio de acción de las auxinas. La primera se enfoca al metabolismo de los ácidos nucleicos y la síntesis de proteínas; la segunda, considera a la pared celular como el sitio de acción (Moore, 1979. p 68).

Desde hace tiempo es claro que, como es de esperar, se requiere la síntesis continua de RNA y de proteínas para el crecimiento continuo de las células (Key, 1964). Combinando esta evidencia con el descubrimiento de que las auxinas pueden estimular la síntesis de RNA y proteínas (Key e Ingle, 1968. pp. 711-722) se formuló la hipótesis de la "activación genética", según la cual la auxina desreprime ciertos genes cuya expresión es necesaria para el proceso de elongación. Numerosos reportes han aparecido apoyando esta hipótesis, aunque también han aparecido otros contradictorios (Zeroni y Hall, 1980. p 520). Esta hipótesis ha perdido mucha fuerza como explicación del estímulo de la elongación celular; sin embargo condujo a que ahora parte de la investigación se ha enfocado al efecto de las auxinas en los ácidos nucleicos y en la síntesis de proteínas, independientemente de lo que pase antes o después en la pared celular.

Desde finales de los años sesentas, muchos investigadores han considerado que la elongación inicial en respuesta a las auxinas, es "demasiado rápida para involucrar a la activación genética como la acción primaria de las auxinas" (Moore, 1979. p

64). Es posible que muchos de los efectos posteriores sean inducidos por el crecimiento y no que induzcan el crecimiento. Otra hipótesis que tomó mucha fuerza, centrada mas bien en la pared celular, es la llamada del "crecimiento ácido". Esta dice que la auxina inicia un mecanismo de acidificación, posiblemente una bomba de protones unida a la membrana, con el resultado de que el pH de la solución en la matriz de la pared celular baje. Algunas o algunas enzimas "debilitadoras de la pared" se activarían, y el proceso continuaria hasta la elongación celular (Thimann, 1971; Moore, 1979. p 80). Un gran número de reportes han aparecido en favor de esta hipótesis, pero también son numerosos los reportes contradictorios (Zeroni y Hall, 1980. pp 521-524. Moore, 1979. p 84). También han aparecido modelos que tratan de conciliar las repuestas rápidas y las respuestas posteriores, pero tampoco gozan de aceptación general (Vanderhoef, 1980. pp. 159-173; Theologis, 1986. pp 429-433).

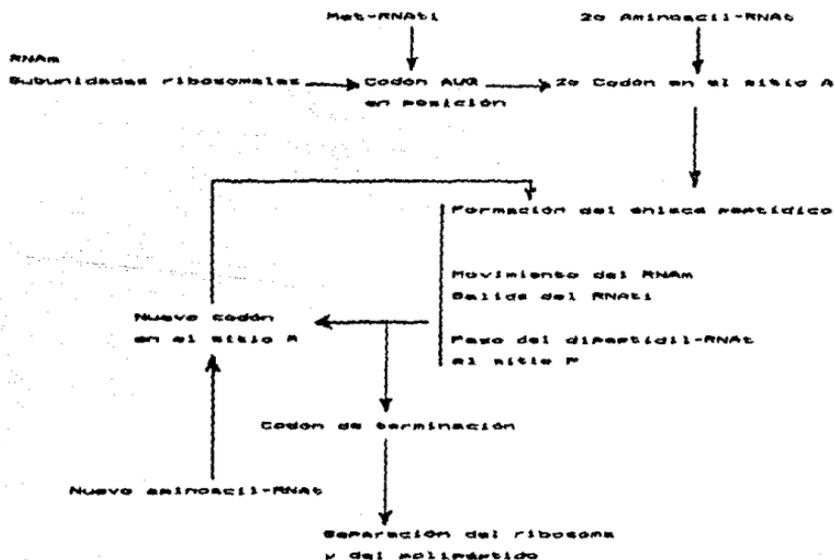
A pesar del tiempo que ha sido dedicado a su estudio, aún no se ha aclarado el mecanismo de uno solo de los efectos causados por las auxinas (la elongación celular). Como se mencionó antes, también se ha tratado de profundizar en el efecto de las auxinas en el metabolismo de los ácidos nucleicos y en la síntesis de proteínas. En el siguiente apartado se revisarán algunos de los trabajos relacionados con aspectos de la regulación de la expresión genética al nivel de la síntesis de proteínas, para posteriormente combinar estos conocimientos con el trabajo con auxinas en relación con la síntesis de proteínas efectuado en nuestro

laboratorio.

### 3. Síntesis de proteínas (traducción) y su control.

El proceso de síntesis de proteínas es sumamente complejo, pues involucra un gran número de componentes y de reacciones (Moldave, 1985). Además del proceso en sí, tienen estrecha relación con él la transcripción, procesamiento y transporte de los RNA mensajeros; y la síntesis de los aminoacil-tRNA (Hershey, Duncan y Mathews, 1986); juntos proveen elementos indispensables para la síntesis de proteínas.

Brevemente, podemos describir la traducción ayudándonos del esquema que se muestra:



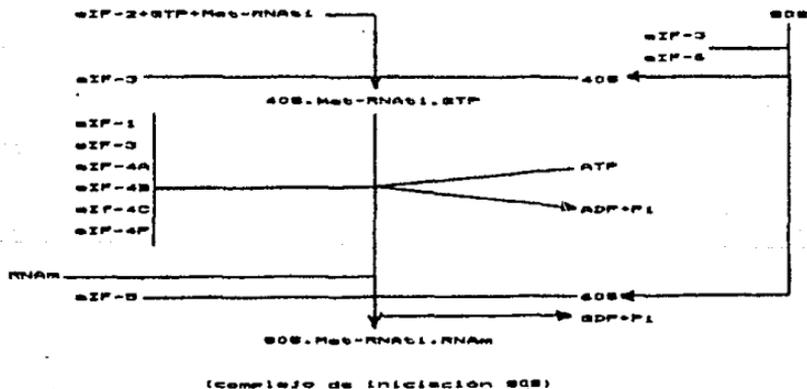
Una buena descripción de este proceso la da Marcus (1982, pp. 113-135), pues combina conocimientos obtenidos en plantas y en animales.

Un ribosoma se une a un RNA mensajero (RNAm) de manera tal que permite la unión de una secuencia inicial de 3 nucleótidos (un triplete: AUG) en el RNAm con el metionil-tRNA iniciador (Met-tRNA<sub>i</sub>). Un segundo aminoacil-tRNA, dictado (codificado) por el triplete de nucleótidos (el codón) que sigue al extremo 3' del triplete inicial en el RNAm, es unido a un sitio de "decodificación" en el ribosoma. A partir de aquí, este sitio sirve como el aceptor para los aminoacil-tRNA entrantes, y se le llama sitio "aceptor" o "A". Enseguida, se forma un enlace peptídico en el cual el grupo carboxilo del aminoacil-tRNA iniciador se une al grupo amino del segundo aminoacil-tRNA. El ribosoma se mueve entonces una distancia equivalente a un triplete, en la dirección 5'-3' a lo largo del RNAm. El tRNA inicial sale y el ahora peptidil-tRNA es translocado del sitio A a un segundo sitio llamado sitio "peptidil" o "P"; el sitio A es ocupado por un nuevo codón. Un nuevo aminoacil-tRNA, codificado por el nuevo codón, se une en el sitio A vacante, y el proceso se repite. Así, el RNAm es traducido en la dirección 5'-3' hasta que se llega a un triplete de terminación, liberándose el ribosoma y el nuevo polipeptido.

Dentro del proceso de traducción se distinguen tres fases bien delimitadas: iniciación, elongación y terminación. En cada fase participan elementos propios (Maitra, Stringer y Chaudhuri, 1982; Moldave, 1985).

La iniciación puede resumirse también como sigue: se forman subunidades 40S ribosomales unidas al factor eIF-3 (eukaryotic initiation factor 3) y un complejo ternario entre Met-tRNA, el factor eIF-2 y GTP. El complejo ternario se une a la subunidad 40S; y a ellos se une el RNAm, que se acomoda en la posición adecuada. Se une entonces la subunidad ribosomal 60S dando el complejo de iniciación 80S (Maitra, Stringer y Chaudhuri, 1982).

El anterior proceso en realidad es sumamente complejo pues intervienen numerosos factores proteicos de iniciación, y aún persisten dudas sobre la secuencia de todos los eventos que se van observando y sobre el papel de algunos de los participantes. En el esquema se presentan algunos de ellos:



La intervención de tan numerosos factores en la interacción

del RNAm con la subunidad 40S ribosomal sugiere la posibilidad de que intervengan en la regulación de su traducción. En mamíferos, particularmente en sistemas de reticulocito de conejo, la fosforilación de la subunidad  $\alpha$  del eIF-2 causa una fuerte inhibición global de la síntesis de proteínas. Dicha fosforilación se promueve (a través de dos cinasas diferentes) por bajos niveles de hemina y por la presencia de RNA de doble cadena (Ochoa y de Haro, 1979; Edelman, Blumental y Krebs, 1987).

La fosforilación de otras subunidades del eIF-2, no parecen tener efecto en la traducción (Ochoa y de Haro, 1979, p 573; Duncan y Hershey, 1987); de los demás factores, existe evidencia de que el eIF-4A y el eIF-4B (que también se fosforilan, aunque no se ha probado si esto altera su funcionalidad) pueden intervenir en la discriminación de RNAs mensajeros (Colini, et al, 1976); el factor "GNEF" (Guanine Nucleotide Exchange Factor) también se inactiva por fosforilación e inhibe entonces la síntesis también de manera global (Dholakia y Wahba, 1988). El factor eIF-4F se fosforila en células de mamífero (Duncan, Milburn y Hershey, 1987) y es capaz de mediar la traducción preferencial de proteínas de heat shock (Panniers, et al, 1985).

En germen de trigo (el sistema vegetal de síntesis de proteínas más estudiado), la fosforilación de la eIF-2 $\alpha$  también inhibe la traducción global de los RNAm. En cambio, la fosforilación de otra subunidad del eIF-2 y la del eIF-3 no afecta su actividad cuando ésta es medida in vitro (Browning, et al, 1985). A diferencia de lo que ocurre en células de mamífero la fosforilación

del eIF-4F no afecta su actividad para iniciar; lo mismo ocurre con el eIF-4B (Humpreys, Browning y Ravel, 1988).

Como señalan Humpreys, Browning y Ravel (1988), aún falta trabajo "...para determinar si la fosforilación/defosforilación de los factores de iniciación de la síntesis de proteínas juega un papel en la regulación de la síntesis de proteínas en células vegetales".

Para iniciar apropiadamente la traducción, el RNAm debe unirse a la subunidad 40S quedando el codón de iniciación AUG en el sitio adecuado. Aparentemente, secuencias cercanas a este codón participan en su reconocimiento (Moldave, 1985. pp 1121-1122). Posiblemente en la unión primera intervengan secuencias complementarias en el RNA ribosomal y los RNA mensajeros (Lewin, 1985. pp 163-165). En procariotes estas corresponden a la secuencia Shine-Dalgarno (Boer, Vassar y Hui, 1986).

Para los ribosomas de Escherichia coli se ha determinado con gran precisión en qué sitio del ribosoma se une el RNAm; varias proteínas ribosomales de la subunidad pequeña se han situado formando parte de este sitio (denominado "plataforma") (Oakes, et al., 1987): las S6, S11, S15, y S18 forman parte de este grupo. Esta situación es prácticamente idéntica en el ribosoma eucariote (Lake, 1985).

El descubrimiento de que varias proteínas ribosomales pueden fosforilarse in vivo e in vitro sugiere que puedan intervenir en el funcionamiento del ribosoma eucariote (Ochoa y de Haro, 1979. p 572). Sobre todo porque ya desde 1979 hay suficiente evidencia

de que la proteína S6 (que se encuentra en la "plataforma") es la principal (aunque no la única) fosfoproteína del ribosoma. Otras proteínas fosforilables en menor medida, incluyen S2, S3, S4, S7, S16, S23/24, L9, L10, L12, L14, L18, y algunas otras de la subunidad 60S (Wool, 1979. pp 735-742; Kisilevski, Treolar y Weiler, 1984).

Sin embargo, en un buen número de reportes, no se encontró efecto alguno de la fosforilación de las proteínas ribosomales sobre alguna función del ribosoma (Wool, 1979. p. 737; Leader, Thomas y Voorma, 1981). Estos reportes incluyen algunas observaciones efectuadas en plantas. No obstante lo anterior desde entonces también se sugiere que la fosforilación al menos tendría alguna relación con la velocidad de traducción (Trewavas y Stratton, 1977); y pronto aparecieron reportes en los cuales sí se han observado alteraciones funcionales en los ribosomas cuyas proteínas se han fosforilado. Inicialmente se obtuvieron evidencias indirectas, como en incremento en la fosforilación de la proteína S6 coincidente con una mayor síntesis de proteínas durante la maduración de huevos de Xenopus (Nielsen, Thomas y Maller, 1982) y en células Swiss/3T3 (Thomas, et al. 1982). Se obtuvieron también, en células HeLa, resultados que pueden interpretarse como una mayor eficiencia de subunidades 40S fosforiladas en la formación de complejos de iniciación, que sus contrapartes no fosforiladas (Nielsen, Duncan y McConkey, 1981; Duncan y McConkey, 1982).

En cultivos de células vegetales (Lycopersicum esculentum)

un tratamiento con calor (heat shock) produce un incremento notable en la fosforilación de la proteína S6, y ello podría participar en el cambio de polisomas presentes antes del shock a los formados de novo tras el shock (que traducen otros mensajes) (Scharf y Nover, 1982).

Aunque no se tiene aún una buena idea de cómo (mecanicamente) puede la fosforilación de algunas de las proteínas ribosomales alterar su funcionalidad, es importante notar que la fosforilación de las proteínas S3, S4, S7, S23/24, L9, L10, L12, L18, L27, L34 y L 36 induce importantes cambios conformacionales respecto a los ribosomas no-fosforilados (Kisilevski, et al., 1984). Ello nos permite pensar en disposiciones diferentes de grupos y secuencias que interaccionen con el RNAm, regulando su unión y posiblemente su traducción.

Existen también algunos reportes en los cuales la fosforilación de la proteína no afecta el crecimiento de células de levadura (Kruse, Johnson y Warner, 1985; Johnson y Warner, 1987). Podríamos pensar que, por lo tanto, algunos sistemas biológicos se comportan con diferente nivel de intensidad a como lo hacen los anteriormente mencionados. Otra posibilidad es que al medir un parámetro global como lo es el crecimiento, no se observe un efecto directo relacionado con la fosforilación de proteínas ribosomales, por participar en el fenómeno muchos otros factores, que podrían evitar que se detectara una correlación entre los dos parámetros.

Como se dijo, la principal proteína fosforilada en los ribo-

somas eucariotes es la S6. Un estudio reciente muestra cómo la fosforilación de ella tiene un efecto sobre la traducción de RNA mensajeros naturales dependiendo de: la cinasa que efectúe la fosforilación (lo cual hace regulable el fenómeno), y el mensaje que se utilice para las pruebas (lo cual indica selectividad de mensajeros). En este artículo Palen y Traugh (1987) proponen que algunos mensajeros responderían a la fosforilación de S6, que otros no se verían afectados, y que una tercera clase respondería dependiendo de otros metabolitos (AMPC en este caso).

Blenis, Spirack y Erikson (1989), así como Oliver, Ballow y Thomas (1988) citan varios ejemplos de condiciones fisiológicas donde varía la fosforilación de S6 (en células animales), y en las cuales se han visto efectos traduccionales. Estos estudios ya son más integrales y avanzan hacia el entendimiento del fenómeno en sus relaciones con el resto del metabolismo celular. Aunque en las plantas hay pocos ejemplos aún, podemos esperar que en los sistemas en que se detecte fosforilación de proteínas ribosomales podamos detectar también cambios en la funcionalidad de los ribosomas.

Posible participación de las auxinas. Desde principios de los 80's se ha obtenido evidencia de que las auxinas pueden participar en la regulación de la expresión genética (Zurfulh y Guilfoyle, 1980; Zurfulh y Guilfoyle, 1982). En los primeros estudios se utilizó la traducción in vitro de los RNA mensajeros para investigar los efectos de las auxinas, y se sugería la posible exis-

tencia de controles postranscripcionales modulados por auxinas (puesto que se encontraban diferencias entre los patrones de síntesis de proteínas in vivo e in vitro). Sin embargo, la aparición de las técnicas de clonado y detección de secuencias específicas de DNA y RNA ha hecho que la atención de la gran mayoría de los investigadores se mantenga en la regulación por auxinas a nivel transcripcional (Hagen, Kleinschmidt y Guilfoyle, 1984; Theologis, 1986; Guilfoyle, 1986; Alliotte, et al, 1989). En mi opinión, el querer usar necesariamente las "nuevas" tecnologías ha evitado que se investigue la existencia de los otros posibles controles postranscripcionales mediados por auxinas.

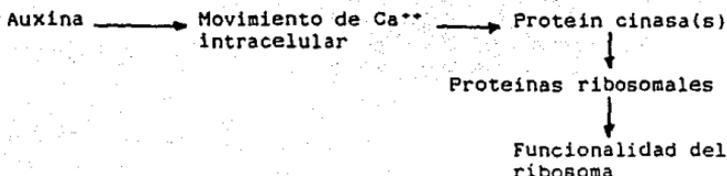
## Introducción

Trabajos efectuados en nuestro laboratorio nos han permitido obtener evidencia que sugiere la existencia de un control post-transcripcional durante la germinación de embriones de maíz. Utilizando  $\alpha$ -amanitina para prevenir la síntesis de RNA mensajeros, se han observado cambios importantes en la síntesis de proteínas in vivo entre las 6 horas y las 24 horas de imbibición de ejes embrionarios de maíz (Sánchez de Jiménez y Aguilar, 1984). Estos cambios consistieron en la aparición de nuevas proteínas que se observan en el análisis de electroforesis bidimensionales. Ya que bajo las condiciones del ensayo no hay síntesis de RNA, la aparición de nuevas proteínas se interpretó como debida a la traducción de mensajeros almacenados en el embrión que aunque presentes desde la etapa de 6 horas, por algún control postranscripcional no se expresan sino hasta una etapa más avanzada de la germinación.

Por otro lado, hemos obtenido evidencia de incrementos en los niveles de auxina libre (AIA) en semillas de maíz durante este mismo periodo de imbibición (Sánchez de Jiménez y Albores, datos no publicados); y, asimismo, se han reportado alteraciones en la fosforilación de proteínas producidas por aplicación de auxinas exógenas (Pérez, Aguilar y Sánchez de Jiménez, 1987), entre las que se ha visto que también son afectadas las proteínas ribosomales (Pérez, 1988).

Con estos reportes, junto con los mencionados en los An-

Antecedentes, nuestro grupo de trabajo ha propuesto un modelo de trabajo:



Es decir, que las auxinas promueven una serie de respuestas bioquímicas entre las cuales está la actividad de una o varias proteín-cinasas, que alteran la fosforilación de las proteínas ribosomales. Esta fosforilación, a su vez, produce cambios en la funcionalidad y la selectividad de traducción de los ribosomas.

Conjuntamente con los eventos a nivel transcripcional que inducen la formación de nuevos RNAm por acción de las auxinas (ver citas mencionadas en los Antecedentes), el modelo anterior nos permitiría explicar los cambios observados en la síntesis de proteínas por la acción de auxinas; y, en especial, este tipo de control a nivel traduccional explicaría las disminuciones en la traducción de algunos mensajes, en las células estimuladas por auxinas, aun cuando ellos estén presentes.

Aunque en nuestro laboratorio utilizamos el modelo anterior, no se excluye la posibilidad de que las auxinas puedan modular la síntesis de proteínas (a nivel traduccional) por medio de otros mecanismos diferentes a la fosforilación de las proteínas ribosomales.

Dentro de este marco de referencia, el objetivo del presente trabajo es verificar si las auxinas producen una alteración en la selectividad de los ribosomas durante el proceso de traducción. Para ello se planteó la siguiente estrategia experimental:

I. Obtener un sistema de traducción heterólogo in vitro que inicie correctamente y en el cual los factores limitantes fuesen únicamente ribosomas (de maíz) y mensajeros exógenos.

De esta manera, se eliminarían otros posibles efectos de la aplicación de auxinas exógenas, al efectuar experimentos in vivo con ejes embrionarios de maíz.

II. Contando con el sistema heterólogo se podría comparar la selectividad de ribosomas extraídos de ejes embrionarios tratados y no tratados con auxinas, traduciendo con ellos un mismo juego de RNA mensajeros y analizando por electroforesis las proteínas sintetizadas. Con este fin se pueden utilizar:

a) los RNAm totales de ejes embrionarios control. Este grupo es muy numeroso y requiere una gran resolución en los patrones electroforéticos bidimensionales para poder analizar las diferencias generadas por las auxinas.

b) seleccionar un grupo de proteínas específicas, cuyos mensajes estén presentes entre los RNAm totales, y seguir su traducción. En este caso se escogió a las histonas, pues se sabe que su síntesis en los embriones de maíz se da ya desde las 6 horas de imbibición (Baiza, Aguilar y Sánchez de Jiménez, 1986).

c) grupos de RNAm específicos heterólogos al sistema de maíz, cuyos productos estén bien caracterizados. Se planeó utili-

zar a los cuatro RNAs genómicos del virus del Bromo-Mosaico (BMV, por sus siglas en inglés). Como ocurre en distintos virus de vegetales, cada uno de los RNAs genómicos del BMV poseen extremos 5' característicos de RNAs mensajeros eucariotes (Van Vloten-Doting, y Neeleman, 1980), cuya secuencia completa ya ha sido establecida (Ahlquist, Dasgupta y Kaesberg, 1984).

Durante la ejecución de este trabajo se montaron todas las metodologías necesarias para los objetivos planteados. Las mismas se reportan adelante; así como las metodologías correspondientes y los datos obtenidos al efectuar las traducciones en el sistema heterólogo de los RNAs virales.

## Materiales y métodos.

### Reactivos utilizados.

La fenilhidrazina, el dietilpirocarbonato (DEPC), la D-glucosa, el ácido N-2-hidroxiethylpiperazin N'-2-etanol sulfónico (hepes), la hemina, el etilenglicol, la creatina cinasa, la creatina fosfato, los aminoácidos no marcados, el ditiotreitól (DTT), el Triton X-100, el ácido Iodoacético, el RNA de levadura, el Tween-20, la nucleasa micrococcal, la urea, el nonidet-P40, el ácido etilenglicol-bis-(β-aminoetil éter)N,N,N',N'-tetraacético (EGTA), el RNA de transferencia (RNAt), el azul de Coomassie, la acrilamida y la bis-acrilamida fueron comprados a Sigma. El ácido bórico fue de Técnica Química. Los filtros GF/C son de Whatman. Las anfolinas se adquirieron de LKB. El NaOH, el NaCl, el ácido acético, el ácido tricloroacético (TCA), el acetato de potasio, el CaCl<sub>2</sub> y el KOH son de Baker. El ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), el ácido indolacético (AIA), el acetato de magnesio, el hidrolizado de caseína, el tolueno, el dimetilsulfoxido, el PPO, el POPOP, el Tris, el fenol, el etanol, el dodecilsulfato de sodio (SDS), el Extrán (neutro), el LiCl, el MgCl<sub>2</sub>, el cloroformo, el alcohol isoamílico, el acetato de sodio, el éter y la sacarosa son de Merck. El KCl fue de Analit. La mezcla de <sup>14</sup>C-aminoácidos se compró en Amersham. La <sup>35</sup>S-Metionina se compró a New England Nuclear (3800 Ci/mmol). El adyuvante completo de Freund es de DIFCO. El anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina es de Kirkegaard and Perry. El NaHCO<sub>3</sub> se

adquirió a JVC. La azida de sodio es de Eastman. El ácido 2,2-metil-4-cloro-fenoxipropiónico (MCPP) fue sintetizado por la Dra. M. Albores del Depto. de Química orgánica, Facultad de Química UNAM.

Preparación de la hemina: para preparar 5 ml de hemina 5 mM en etilenglicol 85% se disuelven 32.5 mg de hemina en 0.250 ml de NaOH 1N. Ya disuelta se añaden 0.250 ml de Tris.HCl 1M pH 7.5 y 4.250 ml de etilenglicol. Se ajusta el pH a 7.8-8.0 con HCl 1N agitando bien al ir añadiéndolo (pues la solución responde despacio). Finalmente, se completa con agua a 5 ml.

#### Material biológico.

Se utilizaron semillas de maíz (*Zea mays* L.) var. "Chalqueño" adquirido en la Productora Nacional de Semillas (Pronase). El BMV nos fue donado por el Dr. R. Beachy de la Universidad de Washington. Este virus fue reproducido en plántulas de cebada y purificado en el Colegio de Posgraduados por el Dr. J. Galindo del Centro de Fitopatología.

Para obtener los ejes embrionarios que se usaron, se sembraron las semillas de maíz en cajas de Petri con una capa de algodón, y se regaron con agua, solución de AIA (5 mg/l) o solución de MCPP (5 mg/l). Las semillas se esterilizaron previamente por inmersión en etanol 70 % durante aprox. 30 segundos, seguidos de 5 minutos en hipoclorito de calcio 5 %, y dos enjuagues finales con agua desionizada.

Después del período de incubación (30 horas para la obtención de ribosomas y aproximadamente 44 horas para la obtención de RNA, a 25-27°C) se disectaron manualmente los ejes embrionarios, congelándolos inmediatamente en N<sub>2</sub> líquido, donde permanecieron hasta el momento de utilizarlos.

#### Extracción de RNA total

El método montado fue el de Sánchez-Martínez, Puigdomènech y Pages (1986). En este artículo el protocolo está descrito muy someramente. Fue necesario hacer numerosas adiciones a fin de obtener resultados reproducibles. El protocolo final quedó estructurado como sigue:

Inicialmente, es necesario lavar y enjuagar exhaustivamente todo el material que se va a utilizar, además de material extra para cubrir faltantes. Para lavar el material, se hierve (excepto los tubos Corex) en SDS 0.2 % (p/v) o en Exrán al 3 % (v/v). Después se enjuaga muy bien con agua corriente, y enseguida exhaustivamente con agua destilada y después con agua desionizada. Se seca boca abajo sobre toallas sanitas (evitando que se introduzcan hebras en los tubos), y se tapa o se cubre (los morteros y los frascos con puntas para micropipeta) con papel aluminio limpio; las pipetas se ponen en pipeteros limpios. Ya secos, se esterilizan los tubos Corex y el material de plástico en el autoclave, y el demás material en un horno a 150°C durante al menos 3 horas. Después de esto, es importante no ensuciar el material (poniéndolo en un lugar protegido del polvo) y no destaparlo si

no es en condiciones estériles o al menos muy protegidas. Es también muy importante trabajar con guantes, tapaboca y propieta, para evitar en lo posible a las RNAsas presentes en la piel, la transpiración y la respiración.

Toda el agua utilizada debe de ser de la mejor calidad disponible, y esterilizada 20 minutos si se utiliza sola.

Las soluciones empleadas deben estar libres de partículas extrañas, filtrándolas si es necesario a través de filtros Millipore de 0.45  $\mu\text{m}$ . Obviamente, deben prepararse y guardarse empleando material muy limpio. Excepto el amortiguador de extracción (ver adelante) y la solución de Urea:LiCl, deben esterilizarse por al menos 20 minutos (cuidando que no cambie su volumen durante la esterilización).

El fenol se destila y se guarda saturado con agua a  $-20^{\circ}\text{C}$ . En estas condiciones se conserva libre de oxidación durante meses.

El amortiguador de extracción se prepara poco antes de iniciar la molienda. Consiste de Tris.HCl 0.2 M pH 8.0, sacarosa 0.35 M, KCl 50 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM, Tritón X-100 1.3 % (p/v) y ácido Iodoacético 1 %. El ácido iodoacético, que inhibe a las RNAsas y otras enzimas, es extremadamente peligroso y debe ser manejado con muchas precauciones (pues penetra incluso a través de la piel).

Para iniciar la extracción, se muelen los ejes (aproximadamente 300 en cada lote) en un mortero "hondo" manteniéndolos congelados todo el tiempo con  $\text{N}_2$  líquido. Esta molienda debe conti-

nuarse hasta llegar a un polvo muy fino, que se pasa rápidamente (con una espátula) a un tubo Corex de 25 ml y se le añade enseguida el amortiguador de extracción. Se agita la mezcla en el vortex suave durante 5 minutos (sin dejar que se caliente) y se centrifuga a 2 000xg durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se pasa con cuidado a otro tubo Corex y se estima su volumen (utilizando otro tubo con agua). Se le añade EDTA hasta 50 mM, NaCl hasta 0.15 M y SDS hasta 1% (10 ml de EDTA 500 mM se preparan disolviendo el EDTA en 6 ml de NaOH 1 M y se lleva entonces a 10 ml; el pH debe ser de 8.0. El NaCl se usa 2.34 M y el SDS 15.56 %). Se añade un volumen igual al resultante, de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (50:48:2) y se agita en el vortex 15 minutos a velocidad apenas suficiente para mantener las fases emulsionadas.

Se centrifuga a 3 000xg 10 minutos a 20°C y se pasa la fase acuosa a otro(s) tubo(s) utilizando una pipeta Pasteur. Se checa que el pH sea aprox.=5, ajustándolo en caso contrario con ácido acético; se añade un volumen igual de Urea:LiCl (8 M:4 M) y se deja toda la noche a 4°C.

Se centrifuga a 10 000xg 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se elimina y la pastilla se disuelve en 10 ml totales de Tris.HCl 50 mM pH 8, SDS 0.5 % (p/v) y EDTA 10 mM. Puede ser necesario calentar a 70°C durante 5 minutos, agitando suave.

Se añade un volumen igual de fenol:cloroformo:isoamílico. Se agita 10 minutos en el vortex y se centrifuga a 3 000xg a 16-20°C durante 10 minutos. Se pasa la fase acuosa (sin interfase) a

otro Corex y se repite la extracción con fenol:cloroformo:isoamilico otras 2 veces.

A la fase acuosa se le añade ahora un volumen igual de cloroformo:isoamilico (96:4). Se agitan 5 minutos en el vortex y se centrifuga como antes 5 minutos.

La última extracción se hace añadiendo a la fase acuosa un volumen igual de éter saturado con agua, agitando y centrifugando durante 5 minutos. El éter (fase superior) se elimina en lo posible con una pipeta Pasteur y el resto se evapora utilizando nitrógeno gaseoso o con vacío. Se estima el volumen resultante y se le añaden 0.11 ml de NaCl 1 M por cada mililitro, y enseguida 2.5 volúmenes de etanol absoluto. Se pone a precipitar a -20°C de preferencia toda la noche (o al menos 3 horas).

Se centrifuga a 10 000xg 20 minutos a 4°C. La pastilla se lava con etanol 80 %, se seca con N<sub>2</sub> gaseoso o con vacío y se disuelve en agua pura (6 ml). De aquí se toman 20 µl para leer en el espectrofotómetro y al resto se le precipita como antes con NaCl y etanol.

Las lecturas de absorbancia deben hacerse a 260 nm y 280 nm. También a 320 nm, donde no deben llegar a 0.01, pues en caso contrario indicaría la presencia de contaminantes.

#### Obtención de RNA del virus del mosaico del tabaco (TMV).

La obtención se hizo siguiendo el método de Bruening, *et al.*, (1976). Se partió de una solución del virus completo (como ribonucleoproteína) 2.86 mg/ml en EDTA 1mM. Deben tomarse todas las

precauciones para evitar a las RNAsas.

En un tubo Eppendorf se ponen 0.5 ml de la solución de TMV. Se le añaden 0.025 ml de SDS 10 % (p/v) y se pasa el tubo a agua hirviendo agitándolo durante 75 segundos (hasta que alcance 80°C). Se enfria en hielo durante 10 minutos.

Se añaden 10 µl de Tris.HCl 0.4 M, ácido acético 0.04 M; y 0.5 ml de fenol equilibrado con Tris.HCl 0.04 M, ácido acético 0.004 M. Enseguida se agita durante 3 minutos, y se centrifuga a 3 000xg 10 minutos a 4°C.

La fase acuosa se pasa a otro tubo y se reextrae con fenol. Esta extracción se repite una vez más. A la fase acuosa final se le añade NaCl hasta 0.1 M y 0.95 ml de etanol absoluto. Se mezclan y se dejan a -20°C toda la noche.

Se pone en la microfuga 10 minutos en el cuarto frío y se elimina el sobrenadante. La pastilla se lava con una mezcla de 32.5 µl de acetato de sodio 2 M, ácido acético 0.2 M, con 650 µl de etanol absoluto y 317.5 µl de agua. Se mezcla suave y se centrifuga 10 minutos en la microfuga. Este lavado se repite otras dos veces. Después, se lava la pastilla una vez con etanol 95 %, se elimina el sobrenadante y se seca la pastilla con vacío. Se resuspende en 200 µl de agua pura, se toman 20 µl para leer absorbancias y el resto se guarda en nitrógeno líquido o a -70°C.

#### Obtención de anticuerpos contra histonas.

Para la obtención de anticuerpos contra histonas se encontró en la bibliografía una metodología descrita (Martinez y Pa-

lau. 1983) que utiliza RNA mezclado con las histonas para formar un complejo antigénico. Sin embargo, en nuestro laboratorio se ha intentado seguir este protocolo en varias ocasiones con muy poco éxito. Por ello se probó una variación del método, asumiendo que la antigenicidad de las histonas es muy poca y que sería necesario estimular en diversas zonas del cuerpo al conejo empleado para obtener mejores resultados. Para intentar la obtención de estos anticuerpos se ensayó el siguiente protocolo. Se disolvieron 1.2 mg de histonas (tipo II, Sigma) en 0.5 ml de NaCl 0.14 M, amortiguador de fosfatos 0.01 M pH 6.8. Aparte, 0.4 mg de RNA (de levadura) en 0.5 ml de la misma solución. Se mezclaron ambas soluciones en proporción 1:1 y se inyectaron en un conejo (1 ml de la mezcla + 1 ml de adyuvante completo de Freund) subcutáneamente. Una semana después se preparó la misma mezcla (histonas, RNA y adyuvante), se puso en el politrón durante 2 minutos y se inyectaron 1  $\frac{1}{2}$  ml en 7 puntos de la espalda, intradérmicamente.

30 días más tarde se obtuvieron 4 ml de sangre de la vena de la oreja del conejo. Se dejaron a temperatura ambiente 1 hora y 20 minutos, y se centrifugó a 2 500xg 10 minutos. Se obtuvieron aprox. 2 ml de suero, que se congelaron a -20°C. Utilizando este suero se hizo una prueba de reacción utilizando histonas disueltas en el amortiguador de fosfatos (con NaCl, el mismo utilizado para la inyección) a una concentración de 1 mg/ml. Se hicieron con él diluciones 1:10, 1:50, 1:100 y 1:200, y cada una de ellas, además de la solución sin diluir, se puso a reaccionar con el suero en tubos capilares. Pudo verse precipitado fácilmente en la

reacción con la solución de histonas sin diluir y en la diluida 1:10.

Se le dió un refuerzo al conejo inyectándole 2 ml de: 0.8 mg de histonas tipo II (Sigma)+0.4 mg de histonas tipo III en 0.5 ml de NaCl 0.14 M, amortiguador de fosfatos 0.01 M pH 6.8; 0.4 mg de RNA de levadura en 0.5 ml del mismo amortiguador; y 1 ml de adyuvante; todo mezclado en el politrón 2 minutos. Se inyectaron 10 dosis de 0.2 ml en distintos puntos de la espalda, intradérmicamente. Sin embargo, este refuerzo no logró incrementar el título del suero obtenido del sangrado 15 días después.

#### Western-blot o "immunoblot".

Para poder identificar a las histonas entre los productos de la traducción in vitro de los RNA mensajeros de ejes embrionarios de maíz se decidió utilizar esta técnica, que en condiciones óptimas iguala o supera al empleo de radiactividad (Butler, 1981). Además, la identificación tiene mayor certidumbre que la localización por movilidad en electroforesis y fluorografía. El mejor marcador para síntesis de proteínas in vitro es la <sup>35</sup>S-metionina. Sin embargo, ésta no es muy útil en este caso pues las histonas sólo contienen 5 metioninas del total de sus aminoácidos (Lewin, 1980. pp 304-310).

Este procedimiento se diseñó después de consultar numerosas referencias, la mayoría de ellas aparecidas en la serie Methods in Enzymology (Tsang, Peralta y Simons, 1983; Haid y Suissa, 1983; Renart y Sandoval, 1984; Ey y Ashman, 1986; Turner, 1986).

Para realizarlo se adaptó el aparato para electroforesis GE-2/4 de Pharmacia, tanto para la electroforesis como para la electrotransferencia.

Inicialmente se hizo un gel de urea-ácido acético como se señala en Spiker (1980). Este gel tuvo un grosor de 3 mm, y se utilizó por estar diseñado para proteínas básicas (como las histonas). Como colorante se utilizó verde de metilo. La corrida se hizo a 300 voltios constantes y duró 4 horas (el colorante alcanzó el extremo inferior del gel).

Se armó entonces el siguiente "sandwich": rejilla de plástico, fibra Scotch Brite, esponja delgada, papel filtro de poro abierto, papel de nitrocelulosa (0.45  $\mu$ ), gel (sacando muy bien las burbujas entre él y la nitrocelulosa), papel filtro, esponja delgada, fibra S.B. y rejilla. Se aseguró todo con ligas, apretando bien pero no excesivamente.

Se realizó la transferencia durante una hora a 75 voltios (que produjeron 200 mA de corriente). Para ello se puso el sandwich en medio de dos electrodos separados 12.5 cm uno de otro. El papel de nitrocelulosa se puso hacia el cátodo, pues la transferencia se hace a pH ácido (con ácido acético 0.7 % como amortiguador).

Se tiñó entonces el papel de nitrocelulosa con amidoblack 0.001 % en Tris-HCl 0.025 M, NaCl 0.15 M pH 7.5 (diluyendo en 100 partes de TBS (Tris.HCl 25 mM, NaCl 0.15M pH 7.5) una parte de una solución de amidoblack 0.1 % en metanol 45 %, ácido acético 10 %). Después de 15 minutos de agitación muy suave, se enjuaga

el papel 4 ó 5 veces con agua desionizada.

Después de enjuagar el papel de nitrocelulosa, se secó con vacío y se guardó seco.

Para bloquear los sitios restantes en el papel de nitrocelulosa se sumergió durante 30 minutos, agitando suave, en TTBSL (TBS+Tween-20 0.1 % y 1 % de leche descremada en polvo). Después se enjuagó con 2 X 30 ml de TTBS (TBS+Tween-20 0.1 %), y se le añadió el 1<sup>er</sup> anticuerpo: 50 ml de TTBS + 250 µl de suero contra histonas (esto es, el suero diluido 200 veces); se dejó toda la noche en agitación suave en el cuarto frío.

Al otro día se quitó el suero y se enjuagó 3 veces 10 minutos con 20 ml (cada vez) de TTBS.

Se añadió el 2<sup>o</sup> anticuerpo (se utilizó anti-IgG de conejo, obtenido en cabra, rehidratado en 1 ml de agua): 40 ml de TTBS+40 µl de solución de anticuerpo, y se agitó suave a temperatura ambiente durante 2 horas.

Se quitó el 2<sup>o</sup> anticuerpo; el papel se enjuagó 2 veces con TTBS y se le añadió la solución de sustrato. Esta se preparó justo antes de usarse utilizando las siguientes soluciones:

a) amortiguador de carbonato ( $\text{NaHCO}_3$  0.1 M,  $\text{MgCl}_2$  1 mM, pH 9.8)

b) solución de NBT (NitroBlueTetrazolium) (1 ml de dimetilformamida 70 %, en el que se disuelven 30 mg de NBT (Sigma)).

c) solución de BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indoíl fosfato) (15 mg de la sal p-toluidina (Sigma) se disuelven en 1 ml de dimetilformamida. O bien, 15 mg de la sal disódica se disuelve en 1 ml

de amortiguador de carbonato).

Las tres soluciones pueden guardarse varios días a 4°C. Se mezcla 1 parte de la solución de NBT, 1 parte de la solución de BCIP, y 100 partes de amortiguador de carbonato.

El papel de nitrocelulosa con las proteínas transferidas se cubrió con la solución de sustrato y se dejó 15 minutos agitando suave ocasionalmente, a temperatura ambiente. Se lavó entonces con agua y se secó.

#### Separación del RNA poli(A)\*.

Esta separación se intentó por la siguiente metodología. Columna de oligo dT-celulosa. Se siguió el protocolo de Perbál (1984). Se utilizó oligo dT-celulosa tipo 7 de P L Biochemicals (que tenía ya un considerable periodo de almacenamiento).

El procedimiento fue el siguiente:

Se montó una columna de aproximadamente 1 ml en amortiguador A (Tris.HCl pH 7.2, NaCl 0.4 M, SDS 0.3 %) y se lavó varias veces con el mismo amortiguador. Se lavó con unos pocos mililitros de NaOH 0.1 M, se llenó con el mismo y se dejó a temperatura ambiente durante 20-30 minutos. Se lavó entonces varias veces con agua destilada, y varias veces con amortiguador A hasta que el pH fuese cercano a 7.

El RNA total se desnaturalizó en agua (a una concentración de 0.5-1.0 mg/0.4 ml de agua) calentándolo a 62-65°C por 1 a 2 minutos y enfriándolo rápidamente en hielo. Ya frío se le ajustó a la concentración del amortiguador A (añadiéndole la cantidad

necesaria de Tris.HCl 1 M pH 7.0-7.2, SDS 10 %, y NaCl 4 M). La muestra se aplicó a la columna, y el tubo se lavó con 0.5 ml de amortiguador A que fueron aplicados también a la columna. Se colectó la solución que pasó por la columna y se repasó otras dos veces a través de ella, colectándola al final. La columna se lavó con 6-7 ml de amortiguador A, colectando fracciones de 1 ml cada una (RNA poli(A)<sup>-</sup>). Para eluir el RNA poli(A)<sup>+</sup> se lavó la columna con agua desionizada, colectando fracciones de 0.5 ml.

Se leyó la absorbancia a 260 y a 280 nm de cada fracción, diluyendo 1:200 las correspondientes al RNA poli(A)<sup>-</sup>. Las fracciones de RNA poli(A)<sup>-</sup> se leyeron directamente (sin diluir), y las tres con mayor absorbancia a 260nm se juntaron en un mismo tubo. Este RNA se puso a precipitar añadiéndole acetato de sodio hasta 0.15 M (pH 5-5.5) y 2.5 volúmenes de etanol absoluto, a -20°C toda la noche. La columna se reequilibró en amortiguador A con 0.5% de azida de sodio, y se guardó a temperatura ambiente.

#### Fraccionamiento del RNA poli(A)<sup>-</sup>.

Ya que se pretendía efectuar la traducción del RNA poli (A)<sup>-</sup> donde posiblemente estarían los mensajeros para histonas (Lewin, 1980. pp 660-663) se decidió eliminar a los RNA ribosomales de mayor tamaño. Después se podría concentrar al RNA restante para utilizarlo en el sistema de traducción in vitro (dicho proceso de concentración es necesario, pues la fracción de mensajeros poli(A)<sup>-</sup> respecto al RNA total es muy pequeña (cita anterior); y, en caso de no separar el RNA ribosomal, se presentan muchos proble-

mas de resuspensión del RNA).

Para la separación se escogió utilizar una columna de filtración en gel. Para ello se tuvieron en consideración los siguientes tamaños del RNA (Stewart y Letham, 1977. Lewin, 1980. pp 686):

RNA ribosomal 28S: 5 000 nucleótidos ( $1.8 \times 10^6$  da)

18S: 2 000 nucleótidos ( $0.7 \times 10^6$  da)

5.8S: 130-160 nucleótidos

5S: 116-120 nucleótidos

RNAm de histonas

H1: 670 nucleótidos (245 000 da)

H4: 400-420 nucleótidos (151 200 da)

Se eligió, por tanto, utilizar Ultrogel Aca 22 de LKB. Esta resina tiene un límite de exclusión de 3 000 000 da para proteínas globulares y un rango de fraccionamiento efectivo de 100 000 a 1 200 000 da para las mismas. Su límite de exclusión estimado para ácidos nucleicos es de 750 pb.

De esta manera, los RNAs de mayor tamaño saldrían en el volumen vacío, y después de ellos todos los restantes en los volúmenes siguientes. En éstos últimos se precipitaría entonces el RNA presente, para utilizarlo posteriormente.

Esta columna se montó y fue utilizada una sola vez. Para seguir la presencia del RNA durante la elución se utilizó un detector UA-4 con unidad óptica tipo 4 de ISCO.

### Preparación del sistema de síntesis de proteínas in vitro.

Los lisados de reticulocito de conejo tratados con nucleasa fueron preparados siguiendo principalmente la técnica de Jackson y Hunt (1983). A la técnica original se le hicieron algunas modificaciones con el fin de adaptarlo a nuestras condiciones de trabajo, y para asegurar en lo posible la obtención de lisado con alta actividad, cada vez que se elaboraba.

Para obtener el lisado crudo, se utilizan dos conejos simultáneamente: uno "joven y pequeño" y otro "adulto y gordo". A ambos se les anemiza inyectándoles subcutáneamente una solución, preparada justo antes de usarse, de fenilhidrazina al 1.25% neutralizada con NaOH, según el siguiente esquema: 1er día, 3 ml; 2o día, 3 ml; 3er día, 3 ml; y 4o día, 2 ml. Al octavo día se les sangra por punción cardíaca, obteniendo la mayor cantidad posible de sangre. Cada sangrado se recibe en EDTA sódico 10% pH 7, para evitar que se coagule, poniendo en la jeringa 0.1 ml para cada 5 ml de sangre; se pasa entonces a un matraz que se tiene en hielo (puede ponerse inicialmente en la jeringa el EDTA necesario para 30 ml de sangre). Se mezcla suavemente. La sangre de cada conejo (siempre por separado) se filtra a través de papel miracloth humedecido en solución salina (ver adelante) a vasitos de precipitado puestos en hielo, y de ahí se pasa a tubos Corex de 25 ml (con tapa) enfriados en hielo también. Se centrifugan a 2000xg 10 min a 4°C.

Se quitan los sobrenadantes y lo más posible de las capas de células blancas con una pipeta Pasteur, y a cada tubo se agregan

10 ml de solución salina (0.134 M NaCl, 5 mM KCl, 7.5 mM Acetato de Mg, 5 mM D-Glucosa y 10 mM Hepes pH 7.2)/30 ml de sangre. Se mezcla suave hasta resuspender y se centrifuga como antes. Se repite este lavado de las células una segunda y una tercera vez, centrifugando al final a 5 000xg (para empacar mejor las células). Se decanta bien todo el sobrenadante, se estima el volumen de las células empacadas y se agrega un volumen igual de agua enfriada en hielo. Se mezcla bien 1 min, y se centrifuga a 15000-xg 20 min a 2°C. El sobrenadante se pasa a través de una malla de nylon fina (aprox. 50 µm), humedecida en agua, a vasitos de precipitado puestos en hielo, y rápidamente se pasan alicuotas a tubos Eppendorf (marcados para cada conejo) que van siendo pasados de inmediato a nitrógeno líquido. Si es posible se almacenan todo el tiempo aquí (en caso contrario al menos a -70°C).

#### Prueba de la actividad del lisado. a) optimización de la concentración de hemina.

Una vez obtenido el lisado crudo se prueba su actividad endógena, y al mismo tiempo se prueban al menos 2 concentraciones de hemina, buscando tanto la mayor actividad como la mayor duración de ésta. Nuevamente se trabaja por separado con cada lisado crudo. Para cada uno de ellos se hace lo siguiente: se preparan tubos Eppendorf de 1.5 ml mantenidos en hielo, con cada una de las cantidades de hemina (5 mM, preparada como se indicó antes) que van a probarse (entre 1 y 10 µl). En cada tubo se ponen también 4 µl de creatina cinasa (5 mg/ml en glicerol 50 %). Se des-

congelan tubos de lisado crudo y se pasan 400  $\mu$ l a cada uno de los tubos anteriores, mezclando bien (poniendo unos segundos en el vortex, sin permitir la formación de burbujas). De cada una de estas mezclas se pasan 18  $\mu$ l a tubos en hielo con 1  $\mu$ l de solución KM (acetato de potasio 2 M, acetato de magnesio 10 mM), 1  $\mu$ l de creatina fosfato (0.2 M), 1  $\mu$ l de mezcla de aminoácidos no marcados (1 mM de todos). El resto de cada mezcla se pasa al nitrógeno líquido, marcado de acuerdo a la concentración de hexi-na. Se añade ahora al primer tubo 1  $\mu$ l de mezcla de  $^{14}$ C-aminoácidos, se agita brevemente en el vortex, se pone en la microfuga unos segundos y se toma una alícuota de 4  $\mu$ l (tiempo cero) que se pasa a solución para decolorar (0.5 ml de peróxido de hidrógeno 5% en NaOH 1 M protegida de la luz); el resto se pone de inmediato a 30°C en un baño de agua.

Estas operaciones (a partir de la adición de los aminoácidos radiactivos) se efectúan rápida y secuencialmente, dejando al menos 20 segundos entre uno y otro tubo.

A los 20, 40 y 60 minutos se toman nuevamente alícuotas de 4  $\mu$ l, pasándolas a solución para decolorar como antes. Después de tomar la última alícuota de todos los tubos de síntesis, se pasan los tubos con peróxido a un baño de agua a 37°C por 10 minutos (para hidrolizar los aminoacil-tRNA); y después se pasan a hielo, donde se les añade a cada uno 2 ml de solución de TCA 25%, hidrolizado de caseína 2% enfriada en hielo; se mezclan y se dejan al menos 30 minutos en el hielo.

Para recoger el material precipitado, se agitan los tubos en

el vortex y se filtra el contenido de los tubos a través de filtros GF/C (no GF/A), lavando 2 veces cada filtro con 3 ml de TCA 8%. Los filtros se secan bajo una lámpara incandescente tipo reflector, y finalmente se cuentan en viales con 5 ml de líquido de centelleo (Tolueno 1 litro, PPO 4 g, POPOP 0.5 g).

b) optimización de la concentración de magnesio.

Una vez que se escoge la concentración de hemina, se prueban varias concentraciones de magnesio, buscando la mayor incorporación de marca en proteína. Para ello se hacen las siguientes soluciones de potasio y magnesio:

("KM 1.5") acetato de potasio 3 M, acetato de magnesio 15 mM

("KM") acetato de potasio 2 M, acetato de magnesio 10 mM

("KM Mg 2/3") acetato de potasio 2 M, acetato de - magnesio 6.66 mM

("KM Mg 1/3") acetato de potasio 2 M, acetato de - magnesio 3.33 mM

Para la prueba en sí, se pone en tubos Eppendorf lo siguiente:

tubo 1	tubo 2	tubo 3	tubo 4
1 $\mu$ l KM Mg 1/3	1 $\mu$ l KM Mg 2/3	1 $\mu$ l KM	1 $\mu$ l KM 1.5
2 $\mu$ l $^{35}$ S-Met			

y se mantienen en hielo.

En otro tubo, también mantenido en hielo, se ponen: 5  $\mu$ l de creatina fosfato, 1  $\mu$ l de creatina cinasa, y 10  $\mu$ l de mezcla de aminoácidos sin metionina (no marcados). Se añaden enseguida 3.5 Densidades Ópticas a 260nm de polisomas (ver adelante). Se descongela un lisado tratado con nucleasa y centrifugado y se pasan 80  $\mu$ l al tubo anterior. Con esta mezcla se van iniciando las reacciones de síntesis de proteínas, pasando 1/5 del volumen final de la mezcla (que variará dependiendo de los polisomas) a los tubos 1 a 4. Estas operaciones se hacen de la misma manera que cuando se efectuó la prueba de actividad endógena (aunque en aquella ocasión se inició añadiendo los aminoácidos marcados), con las excepciones de que los tiempos más convenientes son 0, 10, 20, y 40 minutos, y que las alícuotas para el conteo pueden ser de sólo 2  $\mu$ l (debido a la mayor actividad de la  $^{35}$ S-Met respecto a los  $^{14}$ C-aminoácidos)

De la misma manera que se hizo la optimización para magnesio puede efectuarse para cada componente que interviene en la mezcla. Esto depende de si se desea obtener una incorporación aún mayor; y depende mucho de la disponibilidad de polisomas y de los otros componentes para efectuar pruebas.

#### Obtención de polisomas de maíz.

Para este procedimiento debe utilizarse también material muy limpio y esterilizado, excepto los tubos de ultracentrifuga. Estos deben ser lavados muy bien, y al final enjuagarse con agua desionizada estéril, tapados con aluminio y secados con vacío y

calor suave (30°C).

Las soluciones utilizadas se liberan de RNAsas tratándolas con DiEtilPiroCarbonato (DEPC): una vez preparadas las soluciones se les agrega DEPC hasta 0.1% (v/v), se agitan bien y luego se agitan a intervalos durante 3 horas manteniéndolas bien tapadas. Luego se afloja la tapa y se ponen en baño de María hirviendo por 30 min. Finalmente, se tapan bien y se guardan a 4°C.

Para la extracción de los polisomas, se muelen los ejes embrionarios con N<sub>2</sub> líquido hasta obtener un polvo muy fino. El polvo se pasa a un tubo Corex de 25 ml (con tapa) y se le añaden 8 ml de amortiguador de extracción (Tris.HCl 100 mM pH 8.5, sacarosa 200 mM, acetato de Mg 50 mM, KCl 60 mM, ajustando el pH con HCl 50%; se trata esta solución con DEPC y antes de usarla se le añade DTT, a 5 mM). Se agita el tubo 1 minuto en el vortex, suave. Se centrifuga a 500 -1 000xg 5 minutos a 4°C.

El sobrenadante se pasa a un tubo Corex de 15 ml y se centrifuga a 29 000xg 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se filtra a través de papel miracloth en un embudo Buckner, hacia un matraz Quitasato pequeño (utilizando vacío); y nuevamente es centrifugado a 29 000xg como antes. Mientras tanto, se ponen 3 ml de colchón de sacarosa (sacarosa 1M; Tris.HCl 40 mM, pH 8.5; acetato de Mg 10 mM; KCl 20 mM) en un tubo de ultracentrifuga (de 10 ó 12 ml). El sobrenadante (entre 7 y 8 ml) se pone con mucho cuidado (usando una pipeta Pasteur) sobre el colchón de sacarosa, y se centrifuga a 51 500 ó 52 000 rpm en el rotor 75 Ti (Beckman) durante 2.5 horas a 4°C (o en otro rotor en condiciones equiva-

lentes). Después de esta última centrifugación se eliminan bien el sobrenadante y el colchón, y se enjuaga 1 vez a la pastilla (sin resuspenderla ni despegarla del tubo) con 1/2 ml de amortiguador de resuspensión frío (Hepes.KOH 20 mM pH 7.6, acetato de magnesio 2 mM, acetato de potasio 125 mM, tratar con DEPC y llevar a DTT 1.5 mM) escurriendo muy bien al final. Si es necesario, se seca el tubo con tiras de papel filtro (estériles y secas). Se añaden 30 µl de amortiguador de resuspensión y se resuspende la pastilla utilizando para disgregarla una pipeta Pasteur con punta cerrada. Ya resuspendida se pasa todo a un tubo Eppendorf frío, se toman 2 µl que se pasan a otro tubo y el resto se congelan en nitrógeno líquido (en el cual se almacenan). A los dos microlitros se les agrega 1 ml de agua y se lee su absorbancia a 260 y 280 nm (posteriormente, si la lectura es mayor a 0.7 D.O.<sub>260nm</sub>/µl se ajustará la concentración a este valor; si es menor, se usará un volumen mayor).

#### Tratamiento del lisado con nucleasa y eliminación de ribosomas.

Este tratamiento se hace a partir del lisado crudo. Si es necesario utilizar lisado al cual se le agregó hemina (durante la prueba de actividad endógena) sólo se le agrega lo necesario para completar la concentración escogida, y también vuelve añadirse la creatina cinasa.

En un tubo Eppendorf mantenido en hielo se ponen: los µl escogidos de hemina (como en la prueba, para 400 µl de lisado), 4 µl de creatina cinasa, 3.5 µl de CaCl<sub>2</sub>, y 4 µl de nucleasa mi-

croccocal (endonucleasa micrococcal EC 3.1.31.1; 0.176 unidades/ $\mu$ l según la definición de Sigma). Se descongela un tubo de lisado crudo y se pasan 400  $\mu$ l al tubo anterior. Se mezcla con cuidado y se pone a 20°C durante 15 minutos.

Después de los 15 minutos, se añaden rápidamente (pasando el tubo a hielo) 5  $\mu$ l de EGTA 0.2 M pH 7.5 ( para prepararlo, se disuelven 0.1521 g de EGTA agitando en 0.42 ml de KOH 2 M, luego se añade 1 ml de agua y se sigue agitando; se checa el pH y se afora a 2 ml), se agita y en seguida 2.4  $\mu$ l de tRNA (10 mg/ml, de germen de trigo).

Si al lisado se le van a eliminar los ribosomas, se hace la siguiente centrifugación. Si no, se divide en alícuotas de 50  $\mu$ l (en tubos Eppendorf de 500  $\mu$ l, fríos) y se almacena en N<sub>2</sub> líquido.

Para eliminar los ribosomas, se pasa el lisado a un tubo de policarbonato para la centrifuga TL 100 (Beckman) (lavado muy bien y enjuagado finalmente con agua desionizada estéril) y se centrifuga a 100 000 rpm en el rotor TLA-100.2 de ángulo fijo (o en otro rotor en condiciones equivalentes) durante 20 minutos a 2°C. Al terminar, se divide el sobrenadante en alícuotas como se señaló arriba y se almacena en N<sub>2</sub> líquido.

#### Extracción del BMV (Brome mosaic virus).

Este método nos fue comunicado por el Dr. R. Beachy de la Universidad de Washington. Fue utilizado con algunas modificaciones. Como siempre, hay que trabajar con la mayor limpieza posible

utilizando soluciones tratadas con DEPC y material limpio y esterilizado.

Como ribonucleoproteína, este virus tiene  $E_{260nm}/E_{280nm}=5:1$  mg/ml. Se determinó que la concentración inicial de éste es de 21.6 mg/ml. Se recomienda partir de una concentración de 30 mg/ml, pero en este caso se dejó así.

Se ponen 84  $\mu$ l de virus en cada uno de dos tubos Eppendorf de 1.5 ml (a temperatura ambiente) y se les añaden 166  $\mu$ l de amortiguador TBE (Tris.HCl 89 mM,  $Na_2$ EDTA 2.49 mM, ácido bórico 88.9 mM). Enseguida, se añaden a cada tubo 50  $\mu$ l de SDS 10% y se agitan en el vortex durante 30 segundos. Se añaden 600  $\mu$ l de fenol saturado con TBE, se agitan en el vortex 30 segundos, se dejan reposar 1 minuto y nuevamente se agitan en el vortex durante 30 segundos.

Los siguientes pasos se hacen en el cuarto frío.

Se centrifugan 2 minutos en la microfuga, y las fases acuosas se pasan a otros tubos (cada una por separado) (mantenidos en hielo). El fenol se reextrae añadiéndose 300  $\mu$ l de TBE a cada tubo; se agita en el vortex 30 segundos y se centrifuga 2 minutos en la microfuga.

Las fases acuosas de la reextracción se juntan con sus correspondientes de la primera extracción, y ya juntas se les añaden 300  $\mu$ l de fenol saturado con TBE. Se agita en el vortex durante 30 segundos y se centrifuga 2 minutos. Se separan las fases acuosas a otros tubos, y el fenol se reextrae como antes, pero con 150  $\mu$ l de TBE que finalmente se juntan con sus correspondien-

tes fases acuosas anteriores.

A cada fase acuosa se le añaden 700  $\mu$ l de éter saturado con TBE, se agita en el vortex 30 segundos y se centrifuga durante 30 segundos; después se separa el éter (fase superior) y se desecha. Esta extracción con éter se repite otras dos veces. Debe observarse una interfase blanca que va haciéndose menor en cada extracción con éter; esta interfase debe ir quitándose al ir separando el éter de la fase acuosa (utilizando una pipeta Pasteur).

Después de la tercera extracción, el éter sobrante en la fase acuosa se evapora con vacío o con  $N_2$  gaseoso.

La fase acuosa se separa en alícuotas de 400  $\mu$ l y se le añade a cada una 16  $\mu$ l de NaCl 5 M y enseguida 1 ml de etanol absoluto. Se dejan toda la noche a  $-20^\circ\text{C}$ .

Para recuperar el RNA, se pone 10 minutos en la microfuga en el cuarto frío, desechando el sobrenadante. Las pastillas se resuspenden en NaCl 0.25 M (100  $\mu$ l para cada pastilla proveniente de 400  $\mu$ l, se juntan todas las suspensiones en un solo tubo y se le añaden 2.5 volúmenes de etanol absoluto. Se pone a precipitar a  $-20^\circ\text{C}$  por lo menos 3 horas.

Se centrifuga 10 minutos en la microfuga en el cuarto frío, se descarta el sobrenadante y la pastilla se seca con vacío. Ya seca, se disuelve en 200  $\mu$ l de agua (de la mejor calidad, estéril), se apartan 5  $\mu$ l y el resto se congela en  $N_2$  líquido (donde se almacena).

A la alícuota de 5  $\mu$ l se le añaden 1 ml de agua y se lee la absorbancia a 260nm y a 280nm. Se calcula la concentración a la

que quedó el RNA viral sabiendo que una absorbancia de 0.115 DO/ml equivale a 5 µg/ml.

#### Electroforesis en una dimensión de la reacción de síntesis.

Para analizar las proteínas sintetizadas en el ensayo in vitro se utilizó electroforesis en gel de poliacrilamida siguiendo el método de Laemmli (1970). Cada volumen de mezcla de reacción se mezcló con 5 volúmenes de amortiguador de la muestra. En carriles vecinos se pusieron mezclas de proteínas de peso molecular conocido. Los geles de 12 % de acrilamida y 0.32 % de bisacrilamida se corrieron en un aparato de electroforesis para placas GSE-500 de Hoefer S.I. durante aprox. 6 horas a 2-2.5 mA por carril, con enfriamiento por agua corriente. Fue necesario dejar la corrida durante 1.3 veces el tiempo requerido por el colorante para alcanzar el extremo inferior del gel, para que las bandas se distribuyeran adecuadamente.

Una vez terminada la corrida, los geles se tificaron utilizando azul de Coomassie R250 al 0.2% (p/v) en metanol 50 % (v/v), ácido acético 7% (v/v) durante al menos una hora. Se destificaron mediante varios cambios en ácido acético 7 % (v/v).

#### Electroforesis en dos dimensiones <sup>1</sup>(método de O'farrel, 1975).

Este método se utilizó para analizar las proteínas sintetizadas in vivo, y los productos obtenidos al efectuar traducciones

<sup>1</sup> En la elaboración de los geles de 2a dimensión conté con la valiosa colaboración del M. en C. Raúl Aguilar C., por lo cual deseo expresarle mi agradecimiento.

in vitro con polisomas de maiz. La técnica se siguió como está descrita en el artículo original, utilizando en la primera dimensión un gel cilíndrico de 2 mm de diámetro, con anfolinas en el rango de 3 a 10 de pI. La corrida se hizo en la primera dimensión en un aparato para tubos 150A de Hoefer S.I. durante 18 horas a 400 voltios con enfriamiento por agua. Para la segunda dimensión se utilizó un gel igual al señalado en la electroforesis unidimensional.

#### Fluorografía de los geles de electroforesis.

Para ésta, se trató a los geles como sigue. Se sumergieron durante 30 minutos 2 veces en dimetilsulfóxido (DMSO) 100% a temperatura ambiente. Posteriormente se mantuvieron durante 3 horas en una solución de PPO 22 % (p/v) en DMSO. Se pasaron entonces a agua desionizada durante 1 hora, lavando al final con agua desionizada el PPO precipitado que queda sobre los geles. Finalmente, se secan sobre un papel filtro utilizando un secador con calor y vacío (BioRad M-224) durante 1 hora.

Las fluorografías se imprimieron durante aprox. 3 semanas sobre películas Kodak X-OMat, a -70°C. Se revelaron y fijaron con revelador y fijador Kodak GBX.

#### Densitometrías.

Las densitometrías se efectuaron con un densitómetro GS 300 de Hoefer S.I., ajustando el cero a una parte clara al inicio de cada carril (en las fluorografías) y la máxima señal a la parte

más obscura. El integrador utilizado fue el Mod. 2220 de LKB,  
ajustado según las especificaciones del fabricante.

## Resultados

### 1. Preparación de lisado crudo. Actividad endógena.

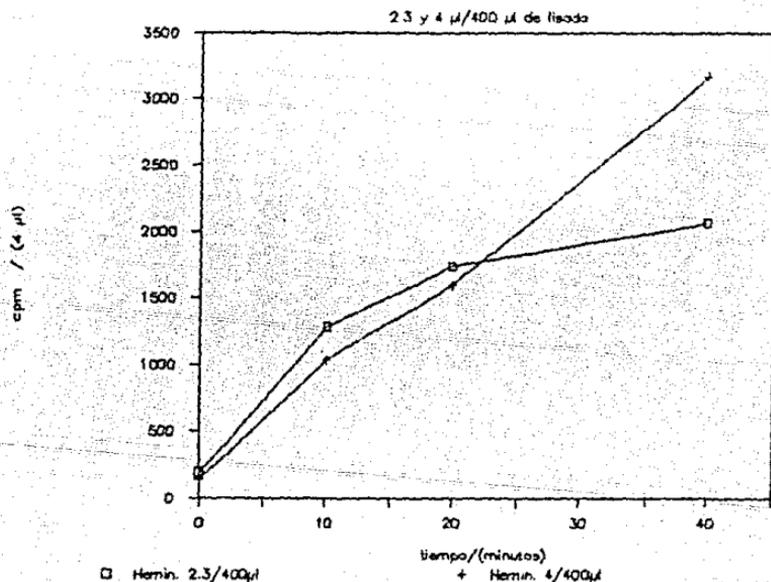
Para la realización de este trabajo se preparó inicialmente un lisado de reticulocito de conejo siguiendo estrictamente la técnica publicada por Jackson y Hunt (citada en Métodos). Nuestra primera meta fue montar un sistema de traducción heterólogo (reticulocito de conejo-embrión de maíz) con capacidad de iniciación y con una buena incorporación sobre la incorporación basal. Después de preparar varios lisados se encontró que la actividad es muy variable de uno a otro lote, aunque fueron preparados con las mismas condiciones. Lo anterior indica la dependencia que tiene la actividad del lisado en relación a la variabilidad biológica del conejo del cual fue obtenido el lisado. Fue necesario, entonces, planear la obtención a partir de al menos dos conejos en cada ocasión, además de realizar pruebas de la concentración de los elementos que influyen fuertemente en el nivel de actividad. Otra modificación que se consideró necesario hacer al protocolo original consistió en romper los reticulocitos en un volumen menor de agua (1 vol. en lugar de 1.5 vols.), para compensar la dilución que supone adicionar ribosomas exógenos en el sistema heterólogo de traducción.

Un resultado representativo de la metodología que se siguió, muestra la influencia de la concentración de hemina sobre la actividad endógena (fig. 1). Al hacer esta prueba ya se había ensayado por separado la actividad endógena del lisado procedente

de cada uno de dos conejos, escogiéndose para continuar el que mostró la mayor actividad.

En la prueba mostrada se utilizó a una mezcla de aminoácidos marcados con  $^{14}\text{C}$ , por lo cual el número de cuentas incorporadas es relativamente bajo al compararlo con los resultados posteriores en los cuales se utilizó  $^{35}\text{S}$ -metionina.

Fig.1. Prueba de conc. de hemina.



Puede observarse en la gráfica que con ambas concentraciones de hemina se obtiene una actividad inicial muy similar, y sin

embargo esta actividad únicamente se mantiene a mayores tiempos con la concentración mayor de hemina. Por tanto se escogió esta concentración para todos los ensayos en los cuales se utilizara este lote de lisado.

Únicamente la concentración de hemina fue ensayada midiendo la actividad endógena del lisado. El otro elemento del cual se probaron diferentes concentraciones en este trabajo, el magnesio, fue ensayado ya en el sistema heterólogo de síntesis (con polisomas de maíz) puesto que se consideró que ya no habría manipulaciones posteriores que alteraran la concentración final.

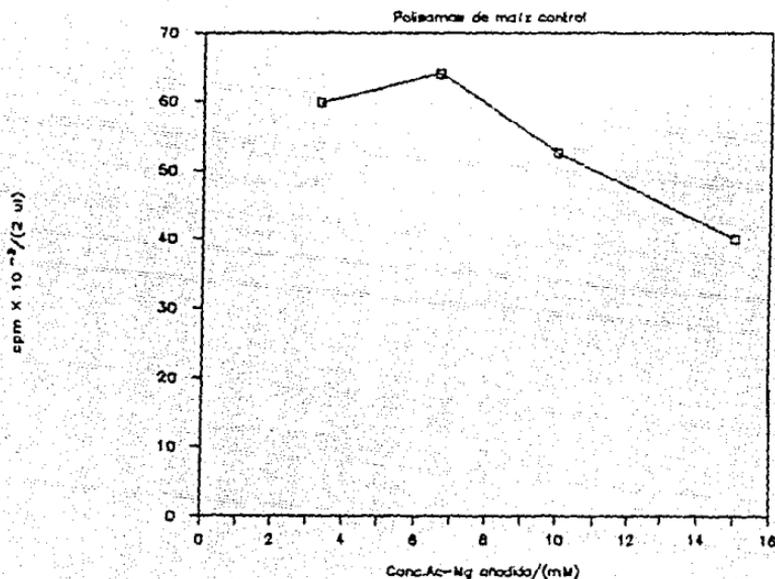
El lisado finalmente mostró una muy buena actividad al ser probado con TMV como mensajero exógeno (no mostrado). El sistema incorpora linealmente hasta aproximadamente los 15 minutos, y después mantiene una buena incorporación hasta los 45-50 minutos; posteriormente, se mantiene lenta. A los 60 minutos hay una incorporación mayor a 20 veces que en el sistema equivalente sin adicionar mensaje exógeno. Resultados similares se obtienen al utilizar BMV como mensajero exógeno, aunque con él la incorporación se mantiene lineal hasta los 60 minutos (Fig. 3).

#### Optimización de la concentración de magnesio. Sistema heterólogo.

Para efectuar esta optimización se hizo un "barrido" utilizando 4 concentraciones de magnesio, tomando como referencia la concentración sugerida por Jackson y Hunt (1983). Ya que se desconoce la concentración endógena de magnesio que trae cada lisado no podemos conocer la concentración final alcanzada tras la adi-

ción de magnesio exógeno. Además de la concentración sugerida por los autores mencionados (10 mM) se utilizaron 1/3, 2/3 y 3/2 de la misma. En la figura 2 se ve el resultado de este experimento:

Fig.2.Prueba de la conc. de Mg.



En este experimento el sistema de síntesis funciona con polisomas de maíz. Para establecer el sistema heterólogo de síntesis se removieron, por ultracentrifugación, los ribosomas de los reticulocitos (aparte de los mensajes de los reticulocitos, tra-

tándolos con nucleasa) y se sustituyeron por polisomas provenientes de maíz germinado durante 30 horas (ver adelante).

Puede observarse que dos de las concentraciones probadas (3 y 6mM) permiten obtener una mayor actividad de incorporación que la alcanzada con la concentración sugerida por la literatura (10mM). La actividad es muy semejante en el caso de las dos concentraciones señaladas primero, y la menor actividad se observa utilizando 15 mM. De manera similar a como se señaló con la hemina, como resultado de esta prueba se escogió la concentración 6 mM para los experimentos en los cuales se utilizara este lote de lisado. Se prefirió ésta sobre la concentración 3 mM por promover una actividad inicial ligeramente mayor.

## 2. Obtención de polisomas funcionales de maíz.

El rendimiento de polisomas obtenidos de ejes embrionarios germinados de maíz varió de una extracción a otra. Esta variación probablemente se debió a que no es posible moler a los ejes exactamente igual (al iniciarse la extracción), y, más probablemente, a diferencias en las condiciones de centrifugación utilizadas. En la tabla que se muestra a continuación puede observarse lo anterior:

Número de ejes	D.O. totales(260 nm)	D.O./eje	Rotor <sup>1</sup>
100	30.25	.302	75 T1
120	13.81	.115	628
100	10.99	.109	628
100	9.67	.096	628
150	31.92	.212	75 T1
150	27.12	.180	75 T1
150	30.78	.205	75 T1

Como puede notarse el rendimiento siempre fue mayor utilizando el rotor 75 T1; con rendimientos menores se obtuvo suficiente para un buen número de experimentos (recordar que se utilizan 0.7 D.O.<sub>260nm</sub> para cada sistema de síntesis).

Aunque se extrajeron varios "juegos" de polisomas (esto es: de maíces control, tratados con AIA o MCPP) únicamente de algunos de ellos se hizo un "barrido" de absorbancias a diferentes longitudes de onda. En la tabla siguiente se muestran algunos datos representativos:

---

<sup>1</sup> El rotor 75T1 (ángulo fijo) es de la marca Beckman; fue utilizado como se menciona en Métodos. El rotor 628 (columpio) es de la marca IEC; se utilizó a la máxima velocidad (41000 rpm) durante 2 h 40 min.

Polisomas	A <sub>230</sub> <sup>2</sup>	A <sub>260</sub>	A <sub>280</sub>	A <sub>320</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>
control	-	.605	-	-	
control	-	.461	-	-	
control	-	1.06	.630	-	1.682
AIA	.253	.366	.217	.013	1.686
AIA	-	.904	.538	-	1.680
MCPP	.221	.322	.190	.013	1.694
MCPP	-	1.02	.617	-	1.653

En las ocasiones en que se midió la absorbancia a 260 y a 280 para la misma muestra de polisomas, la relación entre estas dos absorbancias<sup>2</sup> fue en promedio de 1.679 variando este valor entre 1.694 y 1.653. Estos resultados son muy similares a los obtenidos con ribosomas extraídos utilizando concentraciones más altas de sales (hasta 0.5 M de KCl) y colchones de sacarosa más concentrados.

De la misma manera que ocurre con el lisado crudo, los polisomas pueden almacenarse en nitrógeno líquido, ya resuspendidos

---

<sup>2</sup> Absorbancia a la longitud de onda indicada /  $\mu$ l de suspensión de polisomas (diluido en 1 ml de agua).

<sup>3</sup> La relación de absorbancias a 260/280 nm se usa para estimar la relación ácido nucleico (en este caso RNA)/proteína. Se considera que una relación de 2 corresponde a ácido nucleico prácticamente libre de proteína.

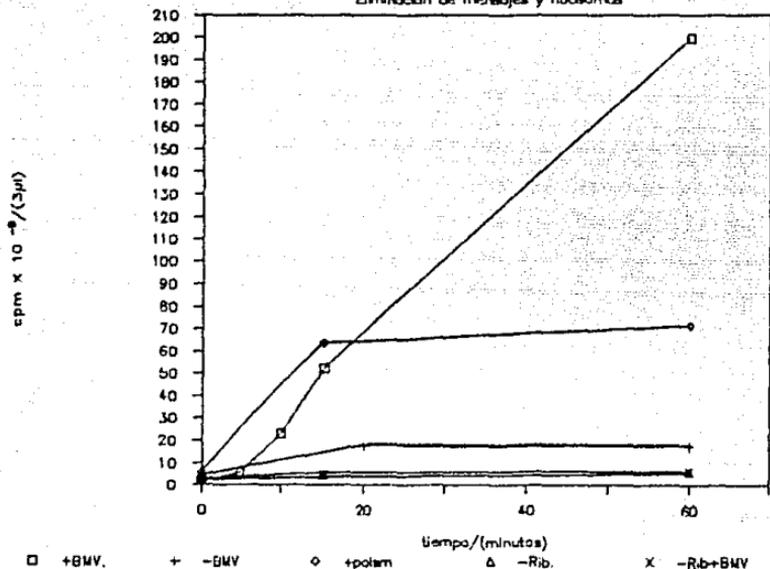
en amortiguador. Guardados de esta manera han mantenido su actividad hasta por seis meses (no se han probado tiempos posteriores, pero podemos suponer que pueden estar en esta condición por tiempos más prolongados, sin sufrir daño).

### 3. Tratamiento del lisado con nucleasa micrococcal y eliminación de ribosomas.

Se comprobó en diversas ocasiones que la metodología seguida elimina efectivamente a los mensajeros endógenos del lisado de reticulocito. Esto puede observarse comparando la incorporación alcanzada en un ensayo de síntesis en el cual a un sistema de reacción de lisado tratado con nucleasa se le adiciona BMV como mensajero exógeno, y simultáneamente se efectúa otra reacción con un sistema idéntico excepto que en lugar de BMV se adiciona un volumen igual de agua (" +BMV" y "-BMV", Fig.3).

Fig. 3. Tratamiento del lisado

Eliminación de mensajes y ribosomas



Puede observarse en esta figura que aunque en el sistema sin mensaje (-BMV) hubo una incorporación cercana a 18 000 cpm, en el sistema con mensaje (+BMV) la incorporación fue muy cercana a las 200 000 cpm.

En la misma figura 3 se muestra el resultado del tratamiento seguido para eliminar los ribosomas endógenos del reticulocito. Para ello se probaron varios tiempos de centrifugación a muy alta

velocidad, después de haber tratado el lisado con nucleasa. Con las condiciones seleccionadas se eliminan adecuadamente los ribosomas del reticulocito. Las gráficas señaladas como "-Rib" y "-Rib+BMV" corresponden a ensayos idénticos a los anteriores, BMV incluido en el segundo, excepto que no se adicionaron polisomas de maíz; su incorporación ("basal") no pasa de 5500 cpm, mientras que la incorporación del mismo sistema adicionado con polisomas ("polism") alcanza 71 600 cpm a los 60 minutos; el incremento es de 13 veces sobre el valor basal.

#### 4. Purificación de RNA del BMV.

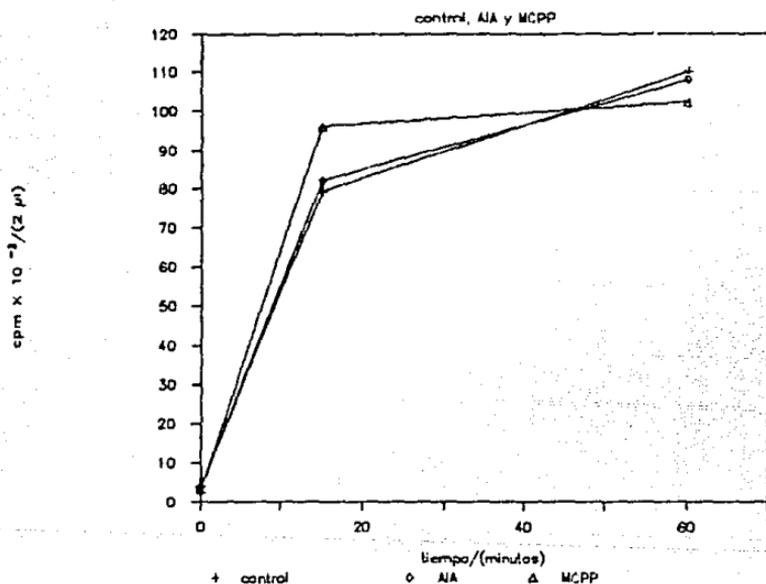
Por medio de la metodología empleada se logró una pureza alta y un buen rendimiento (para nuestros fines) al desproteínizar el BMV. La relación de absorbancias a 260 y 280 nm fue igual a 1.89, superior a la que se señalaba en la metodología original (1.67). En ésta no se señala el rendimiento esperado, por lo que nuestro rendimiento, 381 µgRNA/mg de virus, es bueno sólo en términos relativos. Además, la integridad de al menos 3 de los RNA mensajeros es muy buena, como se verá más adelante.

#### 5. Traducción por polisomas control, AIA y MCPP.

Utilizando las concentraciones de hemina y  $Mg^{++}$  señaladas anteriormente, se pusieron a traducir polisomas extraídos de ejes embrionarios de maíz germinados durante 30 horas, en agua (control), en solución de AIA, o en solución de MCPP. Los resultados se muestran en la figura 4. Aunque la condiciones de síntesis se

establecieron para polisomas de maiz control, los tres tipos de polisomas muestran un comportamiento esencialmente idéntico entre si. Inicialmente hay una incorporación muy rapida, para después permanecer estable. La forma de esta curva y el nivel de incorporación no variaron en lo absoluto al añadir PMSF (10  $\mu$ M) a los 15 minutos en un experimento idéntico (no mostrado).

Fig.4.Traducción de polisomas



Con los productos de traducción obtenidos en este experimento se corrieron geles de doble dimension utilizando la técnica

de O'Farrel (ver Métodos), precipitando previamente con acetona la mezcla de síntesis. La resolución fue pobre, probablemente debido a la presencia de RNA en la muestra (Hames y Rickwood, 1986)(Fig. 5). En esta misma figura se muestran los patrones de síntesis de proteínas in vivo, obtenidos incubando ejes embrionarios de maíz con  $^{35}\text{S}$ -metionina, en presencia o en ausencia de auxinas exógenas (que fueron obtenidos como antecedente de este trabajo). Debe observarse que en los tres casos no son semejantes los patrones in vitro a sus correspondientes in vivo, aun en los lugares donde hay algunas manchas bien definidas.

En los patrones de síntesis in vivo aparecen algunas manchas por efecto de las auxinas. Algunas de ellas se señalan con números en las fotografías correspondientes. Con el tratamiento con MCPP un par de manchas (encerradas en círculos) reducen su intensidad respecto al control. Una diferencia notable entre el AIA (y el control) y el MCPP aparece en la mancha inferior señalada con la letra (A): su intensidad es mucho menor en el caso de la última; otra pequeña mancha (B) reduce también su intensidad.

Este número pequeño de cambios en el patrón electroforético es común al efectuar tratamientos con auxinas (Guilfoyle, 1986, p. 250).

En los patrones in vitro la resolución y la cantidad de manchas no permiten apreciar diferencias relevantes entre cada tratamiento. Estos patrones se obtuvieron para explorar la posibilidad de efectuar experimentos con  $\alpha$ -amanitina y obtener otras evidencias de control traduccional (ver Discusión).

Fig. 5

Patrones de síntesis *in vivo*



Control



AIA



MCP

Fig.5 (Cont.)

Patrones de síntesis *in vitro*

Control



AIA



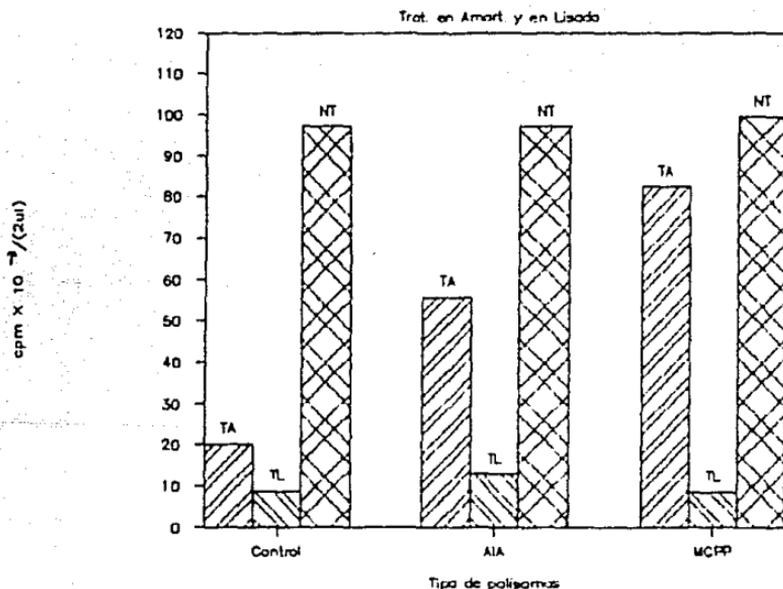
MCPP

## 6. Efecto de la nucleasa sobre los polisomas.

Para probar el efecto de la nucleasa micrococcal sobre los tres tipos de polisomas obtenidos, se adicionaron 0.007 unidades de la nucleasa a 8.4 D.O. de polisomas en amortiguador de resuspensión, y se les incubó durante 5 minutos a 20°C. La reacción se detuvo adicionando EGTA. La nucleasa es la misma preparada y utilizada para el tratamiento del lisado (Fig. 3).

Después de este tratamiento, se pusieron a traducir los polisomas, y se midió la incorporación a los 40 minutos. Los resultados aparecen en la figura 6:

Fig.6.Efecto de nucleasa



Las barras señaladas como NT corresponden a la incorporación obtenida con polisomas No Tratados con nucleasa. Su altura es muy similar entre sí, y sin embargo después del tratamiento con nucleasa en amortiguador (TA) alcanzan valores muy diferentes.

Ya que el tratamiento anterior no elimina efectivamente a los mensajeros unidos a los ribosomas, se decidió intentar el tratamiento con nucleasa de la siguiente manera. Del lisado de reticulocito se removieron con nucleasa los mensajeros y por centrifugación los ribosomas; se adicionaron a éste sobrenadante los polisomas de maiz (de los tres tipos por separado), y ahí se efectuó un nuevo tratamiento con nucleasa. Esto es, en lugar de tratar a los polisomas "en amortiguador" se trataron "en lisado". De esta manera estaban en condiciones (fuente de energía, factores, etc.) de traducir a los mensajeros, moviéndose respecto a ellos y dejándolos susceptibles a la acción de la nucleasa. Después se hizo un ensayo de síntesis de proteínas utilizando estos reticulocitos.

En esta ocasión la incorporación descendió notablemente (TL Fig. 6) llegando a los 40 minutos a alrededor de 10 000 cpm con los tres tipos de polisomas. Esta incorporación es muy pequeña si se considera que, al igual que en los demás experimentos, la "incorporación" al tiempo cero es de aproximadamente 3 000 cpm.

## 7. Traducción del BMV.

Utilizando polisomas tratados con nucleasa de las dos maneras señaladas en el apartado anterior, se efectuaron ensayos de

síntesis de proteínas adicionando RNA del BMV como mensajero exógeno (Fig.7A y B). Contra lo esperado, el BMV estimulo muy poco la incorporación de marca; sólo ligeramente más con los polisomas control tratados "en amortiguador" (figura 7A).

Fig. 7. Traducción de BMV.

(A) polisomas trat. en amortiguador

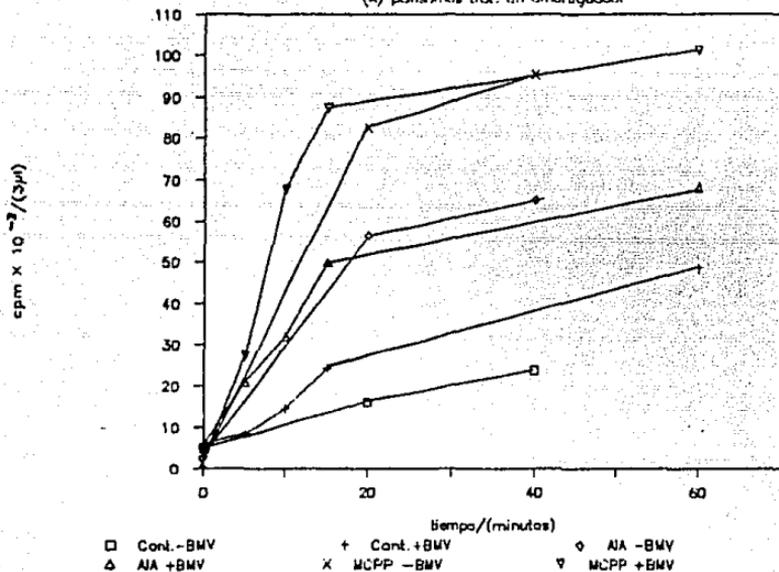
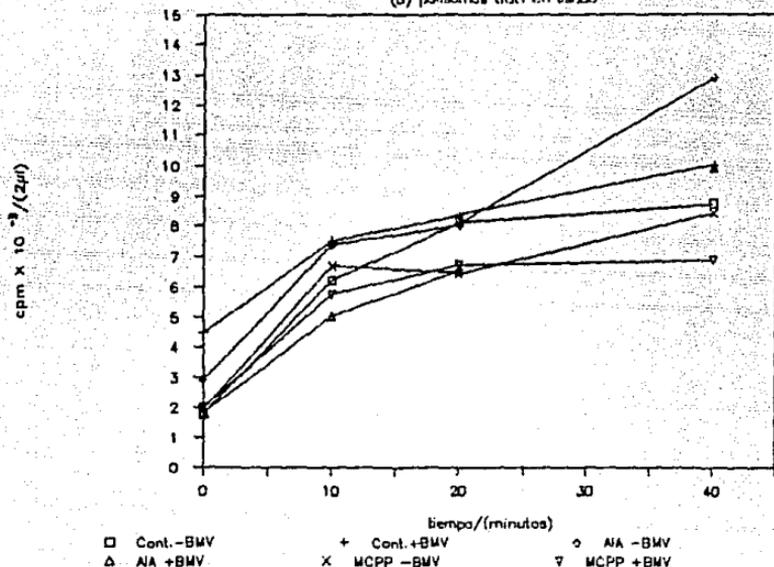


Figura 7

(B) polisomas trat. en banda



Con los productos de síntesis de cada experimento se corrieron geles de 1a dimensión utilizando el método de Laemmli (ver Métodos), con el fin de ver si aun con la falta de estímulo significativo aparecen productos correspondientes al BMV. La figura 8 muestra la fluorografía del experimento correspondiente a la figura 7A:.

Fig. 8. Fluorografía correspondiente a la Fig. 7A.

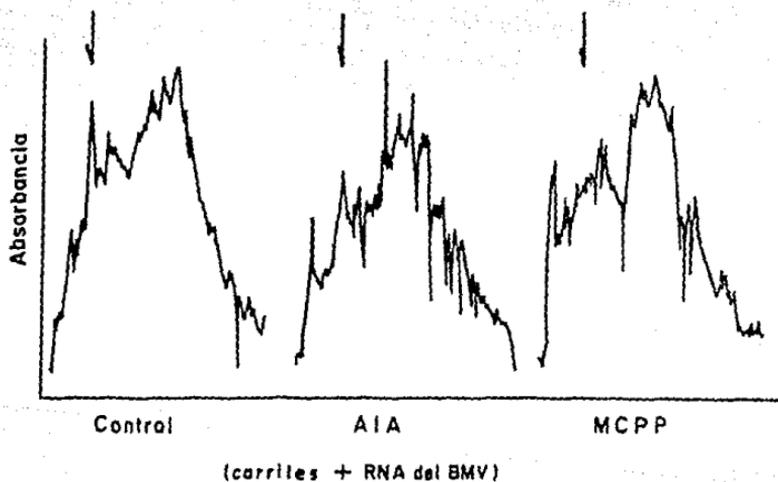
Control		AIA		MCPP			
-	+	-	RC	+	+	-	← BMV



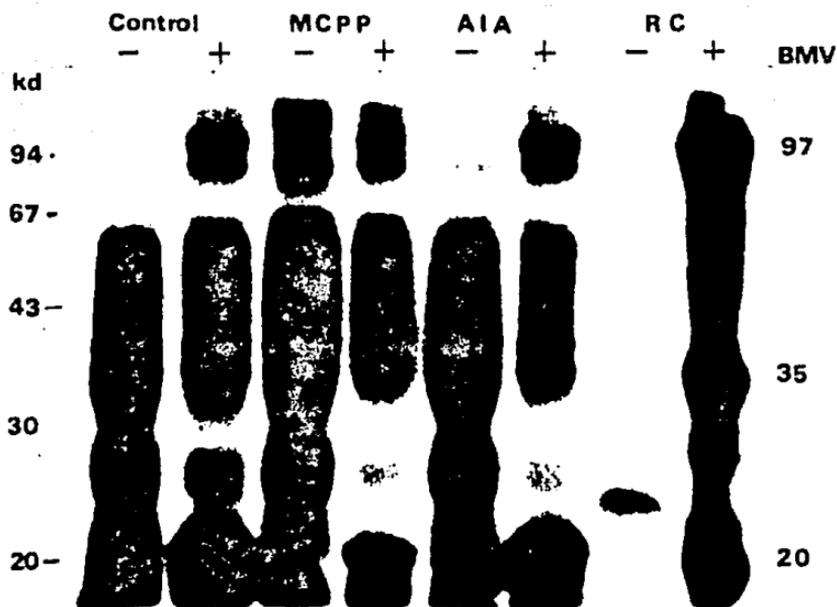
En esta primera fluorografía es difícil distinguir bandas en las partes media e inferior. Sin embargo, en la parte superior puede identificarse una banda que únicamente aparece en los carriles correspondientes a reacciones que incluyeron BMV (el carril central "RC" corresponde a BMV traducido en lisado tratado solamente con nucleasa, conservando sus propios ribosomas). Esta banda es muy notoria en los carriles del control y del AIA (+BMV ambas) y no puede distinguirse en el carril de MCPP (+BMV). Esto es más claro al comparar las densitometrias (Fig. 9). El pico señalado con la flecha corresponde a la banda mencionada. Es

importante señalar que los carriles se cargaron con igual número de cuentas incorporadas, por lo que la intensidad de las manchas es comparable entre cada carril.

Fig. 9. Densitometría de la fluorografía anterior



El patrón obtenido con azul de Coomassie y la fluorografía correspondiente a la síntesis de la figura 7B son mucho más claras (Fig. 10):



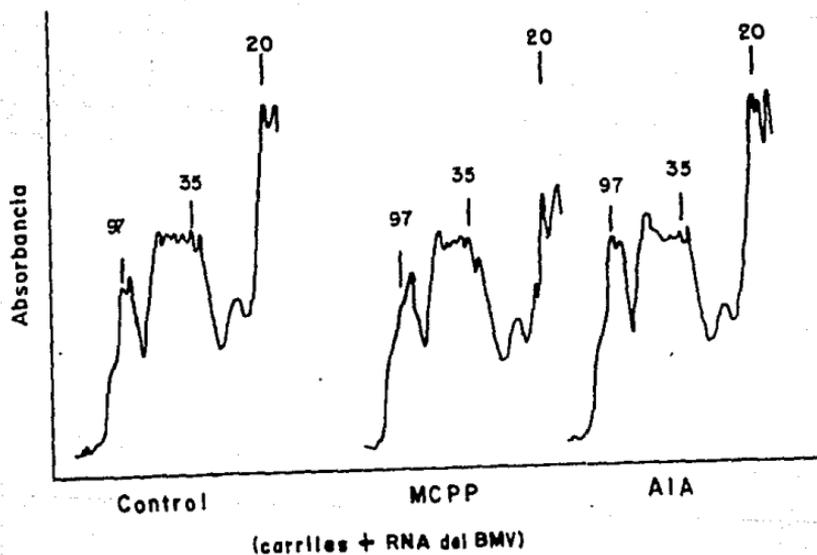
En esta segunda fluorografía se incluyó también un carril de lisado sin mensaje, que no pudo cargarse con igual cantidad de

marca debido a la limitación de volumen que puede utilizarse (para cargar el carril). Es claro sin embargo, que prácticamente no hay proteínas marcadas en él. Asimismo, el carril correspondiente al BMV traducido en lisado se cargó con más marca para que todas las bandas que en él aparecieran fueran distinguibles con claridad.

En esta fluorografía sí pueden distinguirse claramente bandas correspondientes al BMV. Como se mencionó, en la literatura se reporta que la traducción in vitro del genoma del BMV produce cuatro proteínas, de pesos moleculares entre 110 000 a 105 000, 97 000, 35 000 y 20 000 (la proteína de la cubierta) (Zagórski, 1978; Morch et al., 1986). Aquí no se distingue la proteína mayor que muy probablemente no fue sintetizada (ver Discusión); sin embargo se distinguen claramente una de aprox. 97, la de 35 y la de 20 Kd. Estas aparecen también en las traducciones con ribosomas de maíz +BMV, junto con numerosas bandas correspondientes a mensajeros remanentes de maíz.

Visual y cuantitativamente se observan diferencias en la intensidad de las manchas entre el control, AIA y MCFP. En la densitometría correspondiente (Fig. 11) se señalan con flechas los picos de las bandas que corresponden a proteínas del BMV (esto es, que aparecen en el carril del BMV y corresponden a los pesos moleculares reportados). Puede verse que la intensidad de los tres picos no es homogénea con los 3 tipos de ribosomas usados, sino que hay variaciones específicas: el primer pico señalado (97 000 d) apenas aparece como un "hombro" en el carril de

MCPP, y su área por ello no es detectable; además, en el carril del AIA es ligeramente mayor que en el del control. El segundo pico señalado (35 000 d) muestra una intensidad muy semejante para los tres tipos de ribosomas. El último (20 000 d) nuevamente es menor (pero si está presente) con los ribosomas de ejes tratados con MCPP, y ahora la banda es mayor en el control que con AIA.



## Discusión

Son pocos los trabajos publicados en los cuales se utilicen sistemas heterólogos de síntesis de proteínas. En estos casos se ha buscado principalmente hacer comparaciones entre factores de iniciación de diferentes especies. Nombela et al (1975) encuentran que el eIF-2A de reticulocito de conejo y el del crustáceo Artemia salina son prácticamente idénticos en estructura y función. El eIF-2A de Artemia puede promover la formación de complejos ribosomales heterólogos, con subunidad 40S de mamífero y subunidad 60S de crustáceo. Ello ocurre siempre y cuando se incluyan otros factores de iniciación de reticulocito. Asimismo, un sistema de traducción in vitro obtenido a partir de embriones de A. salina es funcional utilizando factores de iniciación de mamífero (Filipowicz, et al, 1976).

Los anteriores estudios parecen indicar que existe un considerable nivel de conservación en los componentes de la maquinaria de traducción entre diferentes eucariotes. Sin embargo, también se han encontrado diferencias considerables. Por ejemplo, el mismo eIF-2 de Artemia salina no necesita de ningún factor adicional para intercambiar GDP por GTP, mientras que en reticulocito de conejo es indispensable la presencia del factor GNEF (Mehta, Woodley y Wahba, 1983). Algunas diferencias se presentan también entre factores de germen de trigo y de reticulocito de conejo. Como se mencionó en los Antecedentes, la fosforilación del factor eIF-4F de reticulocito altera notablemente su funcio-

namiento (Panniers, et al., 1985), mientras que la actividad del eIF-4F de germen no se afecta al ser fosforilado (Humphreys, Browning y Ravel, 1988). Más importante aún es el hecho de que los factores eIF4-A, eIF-4B y eIF-4F de germen de trigo son incapaces de estimular la traducción en un sistema de reticulocito limitante únicamente en estos factores; e incluso en ensayos similares (de sustitución), el eIF-4B y el eIF4-F de trigo inhi-  
ben la traducción (Abramson, et al., 1988). Sin embargo, en el mismo trabajo anterior se encuentra que los correspondientes factores de reticulocito sí logran sustituir (aunque no totalmente) a sus contrapartes en un sistema de germen de trigo.

En otro tipo de estudio, se encontró que las proteínas ribosomales (aisladas y en ribosomas completos) de levadura, germen de trigo e hígado de conejo son susceptibles de fosforilación por cinasas citoplásmicas de cualquiera de las otras dos especies (en experimentos cruzados), obteniéndose incorporaciones y patrones de fosforilación muy semejantes en todos los casos (Grancharova, Getova y Nikolov, 1976). Ello sugiere que la estructura de los ribosomas es muy semejante en estas especies.

En nuestro trabajo el objetivo era montar un sistema heterólogo maiz-reticulocito de traducción in vitro. En él, todos los componentes de la maquinaria de síntesis de proteínas, excepto los ribosomas, pertenecen al reticulocito; y únicamente los ribosomas provienen de los embriones de maiz. Con este sistema se incorpora marca eficientemente al utilizarlo para síntesis de proteínas dirigida por polisomas de maiz (figura 4), en los cua-

les el RNA mensajero ya se encuentra unido a los ribosomas. Sin embargo, al adicionar polisomas de maiz no se logra la misma linealidad en la incorporación que al medir la actividad endógena del lisado o al probar el sistema homólogo con BMV como mensajero exógeno. Ello podría deberse a los polisomas en si o a efectos de la centrifugación sobre el lisado; p.ej., que se eliminaran parte de los factores de iniciación conjuntamente con los ribosomas; a menos que se utilicen concentraciones altas de potasio los factores de iniciación son arrastrados con los polisomas al centrifugar a alta velocidad (Merrick, 1979). Ya que no podemos utilizar este tratamiento con KCl en el lisado, tratamos de disminuir esta posibilidad haciendo el tratamiento con nucleasa antes de hacer la centrifugación. Esperaríamos desensamblar así los polisomas liberando los factores de iniciación que pudiera haber unidos. Aunque el sistema heterólogo si inicia (pues traduce los RNAs del BMV), estos factores podrían ser limitantes. Por ello, si se desea una actividad de incorporación mayor, quizás sea necesario intentar extraer factores de iniciación de la pastilla ribosomal obtenida al centrifugar el lisado, y readicionarlos al sistema.

No obstante lo anterior, tenemos fuertes evidencias de que el sistema si inicia y de manera correcta, pues traduce al menos tres de los RNAs del BMV que se adicionan exógenamente; y los productos obtenidos corresponden a los pesos moleculares esperados, como se discutirá más adelante.

Con las condiciones experimentales utilizadas en este sistema de traducción in vitro, los tres tipos de polisomas usados

(control, y de tejidos estimulados con AIA o con MCPP) incorporaron la marca radiactiva de manera prácticamente idéntica, en cuanto a la cinética del proceso (Fig. 4). Como se mencionó, inicialmente hay una rápida incorporación de marca en material precipitable con TCA y posteriormente ésta se hace muy lenta. Además de la posibilidad ya discutida (limitación de factores de iniciación), la forma de la gráfica también podría sugerir que una RNasa se estuviera sintetizando, o bien, que la síntesis de una proteasa durante el proceso pudiera destruir las proteínas sintetizadas. No se encontraron antecedentes para descartar que haya síntesis de RNAsas, pero el sistema de reticulocito contiene un inhibidor endógeno de RNAsas semejante al obtenido de placenta humana (Scheele y Blackburn, 1979), y este evitaría al menos parcialmente la acción de estas trazas de RNAsas. Respecto a las proteasas, al adicionar PMSF a una concentración final de  $10 \mu\text{M}$  no se modificó en lo absoluto la forma de la gráfica de incorporación, por lo cual no es muy probable la acción de una proteasa. No se intentó aumentar la concentración de PMSF pues entonces se inhibiría la síntesis de proteínas.

Otra posibilidad para explicar tanto la forma de la gráfica de incorporación con polisomas como la baja incorporación obtenida con ribosomas (ver adelante) es que la terminación (de la traducción) fuese un paso limitante, pues si los mensajes no están siendo liberados eficientemente después de ser "leídos" por cada ribosoma entonces no podrían ser reutilizados rápidamente para un nuevo ciclo de traducción. Esto sucedería si los factores

de terminaci3n del reticulocito no trabajaran adecuadamente con los ribosomas de maiz. No se han reportado trabajos en los que se comparen factores de terminaci3n de diferentes especies. Es muy poco probable que alg3n otro componente del sistema de reticulocito (p.ej. la concentraci3n de alg3n ion) fuese responsable de una terminaci3n ineficiente, pues la traducci3n de BMV en el sistema hom3logo (Fig. 3) procede linealmente por al menos 60 minutos (y en los sistemas heter3logos 3nicamente se cambian los ribosomas y quiz3s se disminuya la concentraci3n de factores de iniciaci3n: todos los dem3s componentes son iguales).

Se ha se3alado que la cantidad de potasio en el sistema puede ser inhibitoria de la iniciaci3n, pero el rango en el cual no hay inhibici3n depende del ion acompa3ante: cloruro o acetato (Weber, et al. 1977). Este rango es amplio al usar acetato, que fue el ion utilizado por nosotros. Por esta raz3n no se hizo una prueba de concentraciones de potasio, como se hizo con el magnesio (ver adelante). Por 3sto tambi3n no parece probable que la concentraci3n final de potasio fuese supra3ptima y que ello afectara la traducci3n al grado de ser la causante de la falta de traducci3n del mensaje correspondiente a la proteina de 110 000 (Figs. 8 y 10). En germen de trigo ocurre inhibici3n fuerte de la traducci3n de este mensaje cuando la concentraci3n de potasio es mayor a 110 mM (Chroboczek, Puchkova y Zag3rski, 1980), pero a esta misma concentraci3n es mayor la inhibici3n de la traducci3n del mensaje correspondiente a la proteina de 35 000, misma que s3 est3 siendo traducida en todos nuestros sistemas (Figs. 10 y 11)

(y además claramente en el lisado de reticulocito con ribosomas propios; y, como se mencionó antes, en los otros sistemas se utilizan exactamente las mismas concentraciones de  $K^+$ ). Asimismo, en ese reporte se observa que a esa concentración de  $K^+$  la inhibición de la traducción de la proteína de 97 000 da es completa, la cual es claramente traducida en nuestro sistema. Tampoco se ha eliminado por completo la posibilidad de que nuestros polisomas arrastren algún factor de iniciación. Nosotros hemos obtenido evidencia de que nuestros ribosomas (obtenidos utilizando 60 mM de  $K^+$ ) no acarrean otras proteínas que las que presentan ribosomas extraídos usando 500 mM de  $K^+$  (Pérez-Méndez, A. Comunicación personal). Esta última concentración se utiliza para "limpiar" los ribosomas de reticulocito de conejo de proteínas ajenas a las de la estructura del ribosoma (Merrick, 1979). Mas aún, los factores de iniciación de germen requieren concentraciones menores para liberarse (Lax, et al., 1986); e incluso Sikorski, Przybl y Legocki (1979) sólo logran partículas ribosomales funcionales si éstas son obtenidas utilizando 50 mM de  $K^+$ , pues con mayor concentración parece haber pérdida de proteínas ribosomales. Asimismo, en base a la bibliografía esperaríamos que de haber factores de iniciación de maiz presentes en el sistema heterólogo, la traducción se inhibiría por una probable competencia con los del reticulocito (Abramson, et al., 1988).

Consideraciones parecidas a las señaladas para el potasio pueden hacerse respecto a la concentración de magnesio. Se sabe que diferentes mensajes pueden tener distintos requerimientos de

magnesio para ser traducidos eficientemente (Jackson y Hunt, 1983, p. 66). Puesto que en nuestro trabajo la optimización de magnesio se hizo únicamente con polisomas de maíz control (y el óptimo podría ser diferente para los otros polisomas), y los mensajes utilizados para comparar la selectividad de los ribosomas son los mismos (del BMV), sería necesario que cada tipo de polisomas trajera "atrapadas" cantidades considerables y diferentes de magnesio o de otras moléculas como poliaminas, que pueden inhibir la traducción de mensajes específicos (Kaneji y Pegg, 1986). Por ello la probabilidad mayor corresponde a la alternativa asumida en nuestra hipótesis, es decir, que los ribosomas per se estén modificados y como consecuencia se comporten diferente en las mismas condiciones. Nosotros hemos supuesto que esta modificación consiste en fosforilación de las proteínas ribosomales por las otras evidencias que provienen de nuestro laboratorio (ver Introducción) aunque no descartamos otras posibles modificaciones. En los Antecedentes se comentaron varios ejemplos de cambios en la funcionalidad del ribosoma debidos a fosforilación de sus proteínas (Nielsen, Thomas y Maller, 1982; Thomas, et al., 1982; Nielsen, Thomas y McConkey, 1981; Duncan y McConkey, 1982; Scharf y Nover, 1982; Palen y Traugh, 1987), y también se ha reportado la metilación de proteínas ribosomales de levadura (Lobet, Lhoest y Colson, 1989) sin que se haya buscado algún efecto de la misma.

Sin embargo las anteriores especulaciones no se pueden descartar con los resultados obtenidos en este trabajo. Para ello es

necesario efectuar trabajo adicional encaminado directamente a verificar que la fosforilación de las proteínas ribosomales es la responsable directa del cambio observado en la traducción de los RNAs del BMV.

Efecto de las auxinas en el funcionamiento de los ribosomas, y su posible interpretación.

Los patrones de síntesis de las proteínas solubles producidas in vivo, presentan algunas diferencias importantes entre los tres tipos de ejes embrionarios de maíz, y algunas otras más pequeñas. Estos resultados confirman otros que han sido obtenidos en experimentos similares con hipocotilos de soya y otros tejidos vegetales tratados con auxinas (Guilfoyle, 1986). Es importante notar que, aunque las mayores diferencias se observan al tratar con auxinas a los ejes embrionarios respecto a los ejes no tratados, no son iguales los patrones obtenidos con cada auxina. Como se discutirá más adelante, el AIA y el MCPP también producen respuestas fisiológicas diferentes entre sí al utilizarlos en otros sistemas.

La alteración en la síntesis de proteínas in vivo producida por la aplicación de auxinas puede tomarse como un antecedente compatible con nuestra hipótesis de trabajo, aunque las diferencias observadas pueden deberse tanto a cambios en la población de RNAs mensajeros en cada tipo de ejes embrionarios como a alteraciones en la velocidad de traducción de los mismos. Para discernir entre estas dos posibilidades un experimento adecuado con-

sistiría en obtener los patrones de síntesis de proteínas in vivo incubando a los ejes embrionarios en presencia de  $\alpha$ -amanitina desde el inicio de la imbibición, lo cual causaría la inhibición de la síntesis de nuevos RNA mensajeros. De esta manera los juegos de RNA mensajeros presentes en las células serían los mismos para los tres tipos de ejes embrionarios, esto es, corresponderían a los mensajeros almacenados desde la maduración de la semilla. Nosotros tratamos además de examinar los patrones de síntesis de proteínas in vitro dirigidos por los tres tipos de polisomas, y de compararlos con los patrones in vivo, para confirmar que hay diferentes mensajeros ya en los polisomas obtenidos (esto es, que in vivo al menos algunos de los polisomas cargaron a diferentes mensajes), y que la aparición de nuevas manchas no está controlada a nivel de elongación o de terminación. La poca resolución que obtuvimos, a pesar de que se preparó la muestra de distintas maneras y de que se utilizaron diferentes tamaños de gel, no nos permitió efectuar tal comparación en toda su amplitud. Sin embargo, parecería que hay muy poca diferencia entre los tres patrones electroforéticos de proteínas in vitro (Fig. 5), lo cual indicaría que in vivo existe alguna regulación de la velocidad con la que están siendo traducidos los RNAm ya "cargados" en los polisomas<sup>o</sup>.

---

<sup>o</sup>Mientras esta tesis era escrita se realizaron en el laboratorio los experimentos con  $\alpha$ -amanitina. Se comprobó que la inhibición de la síntesis de RNA poli(A)<sup>\*</sup> fue de 98% respecto a los controles. Los patrones electroforéticos de proteínas sintetizadas in vivo mostraron diferencias entre los ejes emb. tratados con AIA, con MCPP y los No Tratados, dando evidencia de la existencia de control postranscripcional modulado por auxinas.

El tratamiento con nucleasa micrococcal, para eliminar los RNA mensajeros endógenos unidos en los polisomas de maiz, se intentó primeramente adicionando la nucleasa a los polisomas en amortiguador de resuspensión. Con las condiciones utilizadas el lisado de reticulocito muestra claramente una destrucción total de los polisomas (Fig. 3). Para los ribosomas de maiz, sin embargo, el tratamiento fue ineficiente aunque en diferente grado para cada tipo de polisomas (Fig. 6). Es posible que ello se deba a una diferente agregación de los ribosomas sobre cada mensajero; esto es, en los polisomas de tejidos tratados con MCPP los ribosomas estarían más juntos y protegerían más a los mensajes que en los polisomas AIA, y en éstos más que en los control. Aunque yo no repetí esta observación, cabe señalar que en trabajos realizados anteriormente en nuestro laboratorio, también se observaron diferencias al tratar con nucleasa micrococcal polisomas provenientes de embriones de maiz incubados en presencia o ausencia de auxinas (Pérez, L. Comunicación personal). Esto es algo interesante por explorar, pues si la mayor protección es real podría llevar eventualmente a la acumulación de algunos mensajes al darles mayor "estabilidad" (en tejido tratado con auxinas) y por tanto producir mayor concentración de las proteínas correspondientes.

El tratamiento de los polisomas "en lisado" parece más efectivo para eliminar los mensajeros endógenos, juzgando por la incorporación dirigida por los mismos (fig. 6). Con este tratamiento se pretendía hacer que los mensajeros "salieran" de los

ribosomas y quedaran expuestos al ataque de la nucleasa. Se corre, sin embargo, el riesgo de dañar al lisado (p. ej. por desnaturalización de las proteínas) con el doble tratamiento con nucleasa, simplemente por el mayor tiempo en que el lisado está descongelado. Se encontró que aunque la incorporación "endógena" fue drásticamente reducida con este tratamiento, aún aparecen numerosos productos de la síntesis "endógena" (esto es, dirigida por mensajes ya presentes en los polisomas) (Fig. 10; carriles "-BMV"). Además, con los polisomas tratados de una u otra manera sólo se logró estimular ligeramente la incorporación de marca sobre la incorporación basal al adicionar BMV (Fig. 7). Sin embargo, los RNAs del virus si fueron traducidos en el sistema (Figs. 8 y 10). Otra manera en que podría intentarse el tratamiento para eliminar los RNAm endógenos sería resuspendiendo la pastilla de polisomas en amortiguador con bajas concentraciones de magnesio (y con inhibidor de fosfatasas), con el fin de separar ambas subunidades ribosomales y liberar al mensaje (Madjar, Michel, Cozzone y Reboud, 1979). Se adicionaria entonces la nucleasa con  $\text{CaCl}_2$ , y se detendria el tratamiento quelando el calcio con EGTA. Finalmente, se recuperarian las subunidades ribosomales centrifugando a alta velocidad. Después de enjuagarlas y resuspenderlas en el amortiguador adecuado podrian utilizarse en el sistema heterólogo de síntesis.

Posiblemente el tratamiento sugerido eliminaria mejor a los mensajeros endógenos de los polisomas que el tratamiento "en lisado" utilizado en este trabajo.

El análisis de las proteínas sintetizadas en el sistema in vitro se realizó por electroforesis utilizando la mezcla de reacción al término de la incubación. Las proteínas sintetizadas se corrieron en geles unidimensionales y se evidenciaron por fluorografía. En la primera fluorografía mostrada (Fig. 8) aparecen numerosas bandas marcadas, muy cercanas unas de otras en su mayoría. La elevada traducción de mensajeros endógenos y poca resolución en la parte inferior del gel pueden explicar este efecto, lo que también "oculta" la aparición de los productos especificados por el RNA del BMV. Únicamente en la parte superior del gel es posible distinguir bien una banda de proteína del BMV: la correspondiente a la proteína de 97 000 de peso molecular. Visualmente es clara la presencia de esta banda sólo en los carriles donde se corrió el sistema en presencia de RNA del BMV. Asimismo se puede distinguir bien la diferencia en la intensidad de esta banda entre los productos traducidos por polisomas MCPP y los polisomas Control y AIA. En el segundo experimento, en el que se usaron los ribosomas tratados en el lisado para quitarles el RNAm endógeno se tuvo una mejor resolución (Fig. 10). En él se ve nuevamente la aparición de la banda de 97 000 de PM y la diferencia en intensidad señalada arriba se repite cercanamente y con más claridad en esta segunda fluorografía (correspondiente al experimento de la figura 7B). Aquí, aunque nuevamente aparecen numerosas bandas su intensidad es menor equiparable a las de las bandas correspondientes a las proteínas del BMV (pues la traducción endógena se redujo considerablemente), y éstas se distinguen claramente. Es

importante señalar nuevamente que la banda correspondiente a la proteína de 35 000 de peso molecular aparece en las traducciones de BMV con los tres tipos de ribosomas y que su intensidad es prácticamente la misma en los tres casos. Por lo tanto las diferencias de intensidad señaladas para las bandas de 97 000 y de 20 000 (entre Control, AIA y MCPP) parece que se deben a una traducción diferencial de sus mensajes, y no a una inhibición generalizada de la traducción de los mensajes exógenos en alguno de los tipos de ribosomas usados.

Las diferencias en traducción de los RNAs del BMV entre los 3 tipos de ribosomas, con la limitación que representa no haber podido eliminar por completo los mensajeros endógenos, podemos atribuirlos fundamentalmente al tipo de ejes embrionarios de los cuales fueron extraídos los ribosomas (esto es, sin tratar, o tratados con AIA o con MCPP). Como se señaló en la Introducción, hemos encontrado en nuestro laboratorio que el tratamiento con auxinas altera la fosforilación de los ribosomas, y nuevamente el AIA y el MCPP lo hacen de manera diferente. Ello correlaciona con los resultados obtenidos en este trabajo: las diferencias observadas son mayores entre el MCPP y el Control que entre el AIA y el Control. Este comportamiento diferente entre el AIA y el MCPP se ha observado también en el sistema de inducción de callos de maíz: la auxina sintética tiene mucho mayor capacidad para llevar a cabo esta inducción que el AIA (Pérez, Aguilar y Sánchez de Jiménez, 1987). La razón de ello podría ser únicamente que

cada auxina tuviera diferente "potencia", ya sea por estabilidad mayor dentro de las células (AIA se degrada fácilmente), o por diferencias en afinidad de el o los receptores de auxinas que se conoce forman parte del mecanismo de acción de estos fitorreguladores. Sin embargo también existe la posibilidad de que el mecanismo de acción de cada una de estas auxinas no sea completamente idéntico al de la otra. Es conveniente tener en consideración las anteriores observaciones si se hacen estudios con auxinas sintéticas buscando conocer el papel y el mecanismo de acción de la auxina natural.

## Conclusiones. Trabajo a futuro.

Como se señaló en la Introducción, el objetivo del presente trabajo fue investigar si el tratamiento con auxinas produce alteraciones en la selectividad de los ribosomas, utilizando para ello el modelo de ejes embrionarios de maíz en germinación. Aunque este objetivo no se cubrió en toda la extensión deseada, pues no se efectuaron los experimentos con RNA poli(A)<sup>+</sup> y poli(A)<sup>-</sup> endógenos de maíz, los resultados obtenidos aportan evidencia positiva en favor de esta hipótesis. Sin embargo, es necesario efectuar experimentos adicionales para que la evidencia sea completamente clara.

En la Discusión se sugirió una metodología que posiblemente permita eliminar total o casi totalmente a los RNA mensajeros endógenos unidos a los ribosomas de maíz. Esta eliminación es indispensable para evitar cualquier posible efecto de competencia con los mensajeros que se adicionen exógenamente; y permitiría ver de manera completamente clara los productos de traducción de los RNAm que se adicionen exógenamente al sistema heterólogo de traducción (utilizando nuevamente ribosomas provenientes de ejes embrionarios tratados o no con auxinas).

Es conveniente continuar utilizando los RNAs del BMV para estos nuevos experimentos. Al menos 3 de los mensajeros son traducidos adecuadamente en el sistema; y, principalmente, el RNAm correspondiente a la proteína de 97 000 es susceptible de mostrar el efecto de cambio de selectividad buscado en los ribosomas.

Es necesario también asegurarse de que no hay factores de iniciación presentes en los ribosomas de maiz adicionados al sistema heterólogo. Para ellos es conveniente extraer los ribosomas utilizando concentraciones mayores de  $K^+$  durante el proceso, en tanto que los ribosomas permanezcan activos. Se considera que utilizando 500 mM de  $K^+$  se obtienen ribosomas libres de factores de iniciación (Merrick, 1979). Sin embargo en nuestro laboratorio hemos obtenido ribosomas en estas condiciones y han perdido completamente su funcionalidad (Pérez, L. Comunicación personal). Puede ser necesario obtener el patrón electroforético en 2ª dimensión de las proteínas presentes en los ribosomas que permanezcan funcionales al ser obtenidos con la mayor concentración posible de  $K^+$ , y compararlo con alguno ya publicado de ribosomas provenientes de vegetales.

Si los experimentos anteriores resultaran positivos se tendría una evidencia mayor de que la alteración de la selectividad ocasionada por las auxinas reside exclusivamente en el ribosoma.

## Bibliografía.

Abramson, R.D., K.S. Browning, T.E. Dever, T.G. Lawson, R.E. Thach, J.M. Ravel y W.C. Merrick. 1988. Initiation factors that bind mRNA. A comparison of mammalian factors with wheat germ factors. *J. Biol. Chem.* 263 (11): 5462-5467.

Ahlquist, P. R. Dasgupta y P. Kaesberg. 1984. Nucleotide sequence of the bromo mosaic virus genome and its implications for viral replication. *J. Molecular Biology* 172: 369-383.

Alliote, T., C. Tiré, G. Engler, J. Peleman, A. Caplan, M. Van Montagu y D. Inzé. 1989. Auxin-regulated gene of Arabidopsis thaliana encodes a DNA-binding protein. *Plant Physiology* 89: 743-752

Baiza, A. R. Aguilar y Sánchez de Jiménez, E. 1986. Histones and the first cell cycle in maiza germination. *Physiol. Plantarum* 68: 259-264.

Bevan, M. y D.H. Northcote. 1981. Some rapid effects of synthetic auxins on mRNA levels in cultured plant cells. *Planta* 152: 32-35.

Bewley, J.D. y M. Black. 1986. Seeds. Physiology of Development and Germination. Plenum, N.Y.

Bidwell, R.G.S. 1974. Plant Physiology. McMillan, P.C., N.Y. p 331.

Blenis, J., J.G. Spirack y R.L. Erickson. 1989. Phorbol ester, serum, and Rous sarcoma virus transforming gene product induce similar phosphorylations of ribosomal protein S6. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81: 6408-6412.

Boer, H.A., M. Vassar y A. Hui. 1986. "Specialized ribosomes: directing ribosomes to a single mRNA species in Escherichia coli", en Mathews, M.D. (ed.). Translational control. Current Communications in Molecular Biology. Cold Spring Harbor, N.Y. pp 130-138.

Browning, K.S., T.F.J. Yan, S.J. Lauer, L.A. Aquino, M. Tao y J.M. Ravel. 1985. Phosphorylation of wheat germ initiation factors and ribosomal proteins. Plant Physiology 77: 370-373.

Bruening, G., R.N. Beachy, R. Scalla y M. Zaitlin. 1976. In vitro and in vivo translation of the ribonucleic acids of a cowpea strain of tobacco mosaic virus. Virology 71: 498-517.

Butler, J.E. 1981. The amplified ELISA: principles of and applications for the comparative quantitation of class and subclass antibodies and the distribution of antibodies and antigens in biochemical separates. *Methods in Enzymology* 73: 482-523.

Chroboczek, J., L. Puchkova y W. Zagórski. 1980. Regulation of brome mosaic virus gene expression by restriction of initiation of protein synthesis. *J. Virology* 34: 330-335.

Cleland, R.E. y D.C. Rayle. 1977. Reevaluation of the effect of calcium ions on auxin-induced elongation. *Plant Physiology* 60: 709-712.

Dholakia, J.N. y A.J. Wahba. 1988. Phosphorylation of the guanine nucleotide exchange factor from rabbit reticulocytes regulates its activity in polypeptide chain initiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 51-54.

Duncan, R. y E.H. McConkey. 1982. Preferential utilization of phosphorylated 40S ribosomal subunits during initiation complex formation. *Eur. J. Biochem.* 123: 535-538.

Duncan, R. y J.W.B. Hershey. 1987. Translational repression by chemical inducers of the stress response occurs by different pathways. Archives of Biochemistry and Biophysics 256 (2): 651-661.

Duncan, R., S.C. Wilburn y J.W.B. Hershey. 1987. Regulated phosphorylation and low abundance of HeLa cell initiation factor eIF-4F suggest a role in translational control. J. Biol. Chem. 262: 380-388.

Dure III, L.S. y B. Harris. 1979. "Regulation of translation of stored mRNA of dicot seeds", en Bogorad, L. y J.H. Weil (eds). Nucleic Acids and Protein Synthesis in Plants. Plenum, N.Y. pp 279-292.

Edelman, A.M., D.K. Blumental y E.G. Krebs. 1987. Protein serine/threonine kinases. Ann. Rev. Biochem. 56: 567-613.

Ey, P.L. y L. K. Ashman. 1986. The use of alkaline phosphatase-conjugated anti-immunoglobulin with immunoblots for determining the specificity of monoclonal antibodies to protein mixtures. Methods in Enzymology 121: 497-509.

Filipowicz, W., J.M. Sierra, C. Nombela, S. Ochoa, W.C. Merrick y W.F. Anderson. 1976. Polypeptide chain initiation in eukaryotes: initiation factor requirements for translation of natural messenger. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73: 44-48.

Golini, F., Thach, S.S., C.H. Birge, B. Safr, W.C. Merrick y R.E. Thach. 1976. Competition between cellular and viral mRNAs in vitro is regulated by a messenger discriminatory initiation factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73(9): 3040-3044.

Grancharova, T.V., T.A. Getova y T.K. Nikolov. 1976. Phosphorylation of ribosomal proteins from eukaryotes in homologous and heterologous cell-free systems. Biochimia et Biophysica Acta 418: 397-403.

Guilfoyle, T.J. 1986. Auxin-regulated gene expression in higher plants. Critical Review in Plant Science 4(3):247-276.

Hagen, G., A. Kleinschmidt y T. Guilfoyle. 1984. Auxin regulated gene expression in intact soybean hypocotyl and excised hypocotyl sections. Planta 162: 147-153.

Haid, A., y M. Suissa. 1983. Immunochemical identification of membrane proteins after sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Methods in Enzymology 96: 192-205.

Hames, B.D. y D. Rickwood. 1986. Gel electrophoresis of proteins. IRL press, p 194.

Hershey, J.W.B., R. Duncan y M.B. Mathews. 1986. "Mechanism of translational control" , en Mathews, M.D. (ed.). Translational control. Current Communications in Molecular Biology. Cold Spring Harbor, N.Y. pp 1-8.

Huang, B., S. Rodaway, A. Wood y A. Marcus. 1980. RNA synthesis in germinating embryos of soybean and wheat. *Plant Physiology* 65: 1155-1159.

Humphreys, J. K.S. Browning y J. Ravel. 1988. Identification of a kinase in wheat germ that phosphorylates the large subunit of initiation factor 4F. *Plant Physiology*, 88: 483-486.

Jackson, R.J. y T. Hunt. 1983. Preparation and use of nucleasa-treated rabbit reticulocyte lysates for the translation of eukaryotic messenger RNA. *Methods in Enzymology* 96: 51-74.

Johnson, S.P. y J.P. Warner. 1987. Phosphorylation of the Saccharomyces cerevisiae equivalent of ribosomal protein S6 has no detectable effect on growth. *Molecular and Cellular Biology* 7(4): 1338-1345.

Kaneji, T., y A. Pegg. 1986. Inhibition of translation of mRNAs for ornithine decarboxylase and s-adenosylmethionine decarboxylase by polyamines. J. Biol. Chem. 262(6): 2427-2430.

Key, J.L. e Ingle, J. 1968. "RNA metabolism in response to auxin", en Whightman, F., y G. Stterfield (eds). Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances. Range press, Ottawa. pp. 711-722.

Key, J.L. 1964. Ribonucleic acid and protein synthesis as essential processes for cell elongation. Plant Physiology, 39: 365-370.

Kisilevski, R., M.A. Treolar y L. Weiler. 1984. Ribosome conformational changes associated with protein S6 phosphorylation. J. Biol. Chem. 259: 1351-1356.

Kruse, C., S.P. Johnson y J.R. Warner. 1985. Phosphorylation of the yeast equivalent of ribosomal protein S6 is not essential for growth. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 7515-7519.

Laemmli, V.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.

Lake, J.A. 1985. Evolving ribosome structure: domains in archaeobacteria, eubacteria, eocytes and eukaryotes. Ann. Rev. Biochem. 54: 507-530.

Lax, S.R., S.J. Lauer, K.S. Browning y J.M. Ravel. 1986. Purification and properties of protein synthesis initiation and elongation factors from wheat germ. Methods in Enzymology 118: 109-128.

Leader, D.P., A Thomas y H.D. Voorma. 1981. The protein synthetic activity in vitro of ribosomes differing in the extent of phosphorylation of their ribosomal proteins. Biochimica et Biophysica Acta 656: 69-75.

Lewin, B. 1980. Gene Expression. 2a ed. V.2. John Wiley & Sons.

Lewin, B. 1985. Genes. 2a ed. John Wiley and sons, N.Y.

Lobet, Y., J. Lhoest y Ch. Colson. 1989. Partial purification and characterization of the specific protein-lysine N-methyltransferase of YL32, a yeast ribosomal protein. Biochimica et Biophysica Acta PRO. 997: 224-231.

Madjar, J.J., S. Michel, A.J. Cozzone y J.P. Reboud. 1979. A method to identify individual proteins in four different two dimensional gel electrophoresis systems: application to Escherichia coli ribosomal proteins. *Analytical Biochemistry* 92: 174-182.

Maitra, U., E.A. Stringer, y A. Chaudhuri. 1982. Initiation factors in protein biosynthesis. *Ann. Rev. Biochem.* 51: 869-900.

Marcus, A., J. Feeley y T. Volcani. 1966. Protein synthesis in imbibed seeds. III. Kinetics of aminoacid incorporation, ribosome activation and polysome formation. *Plant Physiology* 41:1167-1172.

Marcus, A. 1982. "Ribosomes, polysomes and the translation process", en Boulter, D. y B. Parthier (eds). Encyclopedia of Plant Physiology. Vol. 14A. Cap. 3. pp. 113-135.

Martínez, P. y J. Palau. 1983. Antigenic variability among very-lysine-rich histones from calf thymus and from sperm of different echinoderms. *Comp. Biochem. Physiol.* 74-B(3): 611-617.

Mehta, H.B., C.L. Woodley y A.J. Wahba. 1983. Protein synthesis in Brine shrimp embryos and rabbit reticulocytes. J. Biol. Chem. 258: 3438-3441.

Merrick, W.C. 1979. Assays of eukaryotic protein synthesis. Methods in Enzymology 60: 101-108.

Moldave, K. 1985. Eukaryotic protein synthesis. Ann. Rev. Biochem. 54: 1109-1149.

Moore, T.C. 1979. Biochemistry and Physiology of Plant Hormones. Springer-Verlag, N.Y.

Morch, M.D., G. Drugeon, W. Zagorski y A.L. Henni. 1986. The synthesis of high-molecular-weight proteins in the wheat germ translation system. Methods in Enzymology 118: 154-164.

Nielsen, P.J., R. Duncan y E.H. McConkey. 1981. Phosphorylation of ribosomal protein S6: relationship to protein synthesis in HeLa cells. Eur. J. Biochem. 120: 523-527.

Nielsen, P.J., G. Thomas y J.L. Maller. 1982. Increased phosphorylation of ribosomal protein S6 during meiotic maturation of Xenopus oocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79: 2937-2941.

Nombela, C., N.A. Nombela, S. Ochoa, W.C. Merrick y W.F. Anderson. 1975. Nature of eukaryotic proteins required for joining of 40S and 60S ribosomal subunits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 63: 409-416.

Oakes, M., A. Scheinman, M. Rivera, D. Soufer, G. Shankweiler y J. Lake. 1987. "Evolving ribosome structure and function: rRNA and the translational mechanism", en Cold Spring Harbor Symposia Quantitative Biology, Vol. LII. pp 675-685.

Ochoa, S. y C. de Haro. 1979. Regulation of protein synthesis in eukaryotes. *Ann. Rev. Biochem.* 48: 549-580.

O'farrel, P.H. 1974. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250: 4007-4021.

Oliver, A.R., L.M. Ballow y G. Thomas. 1988. Differential regulation of S6 phosphorylation by insulin and epidermal growth factor in Swiss mouse 3T3 cells: insulin activation of tipe I phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 4720-4724.

Palen, E. y J.A. Traugh. 1987. Phosphorylation of ribosomal protein S6 by cAMP-dependent protein kinase and mitogen-stimulated S6 kinase differentially alter translation of globin mRNA. *J. Biol. Chem.* 262(8): 3518-3523.

Panniers, R., E.B. Stewart, W.C. Merrick y E.C. Henshaw. 1985. Mechanism of inhibition of polypeptide chain initiation in heat shocked Ehrlich cell involves reduction of eukaryotic initiation factor 4F activity. J. Biol. Chem. 260 (17): 9648-9653.

Perbal, B. 1984. A Practical Guide to Molecular Cloning. John Wiley & Sons. p 393.

Perez, L., R. Aguilar y E. Sanchez de Jiménez. 1987. Effect of and exogenous auxin on maize tissues. Alteration of protein synthesis and phosphorylation. *Physiol. Plantarum* 69: 517-522.

Perez, L. 1988. Tesis Doctoral. Facultad de Química, UNAM.

Renart, J., e I.V. Sandoval. 1984. Western blots. *Methods in Enzymology* 104: 455-460.

Salisbury, F.B. y C.W. Ross. 1978. Plant Physiology. 2a ed. Wadsworth Publishing Co., Belmont USA.

Sánchez de Jiménez, E. y R. Aguilar. 1984. Protein synthesis patterns. *Plant Physiology*, 75: 231-234.

Sánchez de Jiménez, E., R. Aguilar y S. López. 1981. Distinctive characteristics of protein synthesis in maize embryos during the early stages of germination. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 99(2): 445-450.

Sánchez-Martínez, D., P. Puigdomènech y M. Pages. 1986. Regulation of gene expression in developing Zea mays embryos. *Plant Physiology* 82: 543-549.

Scharf, K. y L. Nover. 1982. Heat shock-induced alterations of ribosomal protein phosphorylation in plant cell cultures. *Cell* 30: 427-437.

Scheele, G., y P. Blackburn. 1979. Role of mammalian RNase inhibitor in cell-free protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 76: 4898-4902.

Seal, S.N., M. Giensen, R. Roman y A. Marcus. 1977. "Functional characterization of the initiation factors of wheat germ", en Bogorad, L. y J.H. Weil (eds.). Nucleic Acids and Protein synthesis in Plants. Plenum, N.Y. p 167.

Sikorski, M.M., D. Przybyl y A.B. Legocki. 1979. The ribosomal proteins of wheat germ. Distribution and phosphorylation in vitro. *Plant Science Letters* 15: 387-397.

- Simon, E.W. 1984. "Early events in germination", en Murray, D.R. (ed). Seed Physiology. Vol. 2. Cap. 3. pp
- Spiker, S. 1980. A modification of the acetic-urea system for use in microslab polyacrylamide gel electrophoresis. Analytical Biochemistry 108: 263-265.
- Stewart, P.R. y D.S. Letham (eds). 1977. The Ribonucleic Acids. 2a ed. Springer-Verlag.
- Strasburger, E., F. Noll, H. Schenck, y A.F.W. Schimper. 1974. Tratado de Botánica. 6a ed. Ed. Marín, Barcelona.
- Theologis, A. 1986. Rapid gene regulation by auxin. Ann. Rev. Plant Physiol. 37: 407-438.
- Thimann, K.V. 1971. "Auxin, and informal summary of some recent work", en Kaldeney, H. y Y. Vordar (eds.). Hormonal regulation in plant growth and development. Proc. Adv. Study Inst. Izmir. pp 155-170. Verlag Chemie, Weinheim (RFA).
- Thomas, G., J. Martín-Pérez, M. Siegman y A.M. Otto. 1982. The effect of serum, EGF, PGF<sub>2α</sub> and insulin on S6 phosphorylation and the initiation of protein and DNA synthesis. Cell 30: 235-242.

- Trewavas, A. y B.R. Stratton. 1977. "The control of plant growth by protein kinases", en Bogorad, L. y J.H. Weil (eds.). Nucleic Acids and Protein synthesis in Plants. Plenum, N.Y. pp 309-319.
- Tsang, V.C., J.M. Peralta y A.R. Simons. 1983. Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot techniques (EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis. *Methods in Enzymology* 92: 377-391.
- Turner, B.M. 1986. Use of alkaline phosphatase-conjugated antibodies for detection of protein antigens on nitrocellulose filters. *Methods in Enzymology* 121: 848-855.
- Vanderhoef, L.M. 1980. "Auxin-regulated cell enlargement: is there action at the level of gene expression?", en Leaver, C.J. (ed). Genome Organization and Expression in Plants. Plenum, N.Y. pp 159-173.
- Van Vloten-Doting, L. y L. Neeleman. 1980. "Translation of plant virus RNAs", en Leaver, C.J. (ed). Genome Organization and Expression in Plants. Plenum, N.Y. pp 511-527.
- Walbot, V. 1972. Rate of RNA synthesis and tRNA end-labeling during early development of Phaseolus. *Planta* 108:161-171.

Weber, L.A., E.D. Hickey, D.L. Nuss y C. Baglioni. 1977. Inhibition of protein synthesis by  $Cl^-$ . J. Biol. Chem. 252: 4007-4010.

Wool, I.G. 1979. The structure and function of eukaryotic ribosomes. Ann. Rev. Biochem. 48: 719-775.

Zagórski, W. 1978. Translational regulation of expression of the Brome Mosaic Virus RNA genome in vitro. Eur. J. Biochem. 86: 465-472.

Zeroni, M., y M.A. Hall. 1980. "Molecular effects of hormone treatment on tissue", en MacMillan, J.(ed). Encyclopedia of Plant Physiology. Vol. 9. Cap. 6. pp 511-586.

Zurfulh, L.L. y T. Guilfoyle. 1980. Auxin-induced changes in the patterns of protein synthesis in soybean hypocotyls. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77: 357-361.

Zurfulh, L.L. y T. Guilfoyle. 1982. Auxin induced changes in the population of translatable messenger RNA in elongating sections of soybean hypocotyls. Plant Physiology 69: 332-337.