

20  
24



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**"ANALISIS ELECTROFORETICO DEL  
EFECTO DE LAS AUXINAS EN LAS  
PROTEINAS RIBOSOMALES DE  
COLEOPTILOS DE MAIZ"**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE**

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

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

**MARIA ELISA BRIONES ROSALES**

MEXICO, D. F.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

1991



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

Todo el material contenido en esta tesis 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.

## INDICE

|      |   |    |
|------|---|----|
| I.   | INTRODUCCION  |    |
|      | Planteamiento del problema .....  | 1  |
|      | Hipótesis de trabajo .....  | 2  |
|      | Objetivos .....   | 3  |
| II.  | ANTECEDENTES  |    |
|      | Auxinas .....   | 6  |
|      | Ribosomas .....   | 21 |
| III. | PARTE EXPERIMENTAL  |    |
|      | Diseño Experimental .....   | 34 |
|      | Material .....  | 36 |
|      | a) Equipo   |    |
|      | b) Reactivos  |    |
|      | c) Material Biológico   |    |
|      | Metodología .....   | 37 |
|      | a) Preparación de material biológico  |    |
|      | b) Pulsos con ortofosfato- <sup>32</sup> P                                      |    |
|      | c) Extracción y cálculo de rendimiento de ribosomas                             |    |
|      | d) Obtención y cálculo de rendimiento de proteínas ribosomales                  |    |
|      | e) Electroforesis en una y dos dimensión de geles de poliacrilamida.            |    |
|      | f) Autorradiografía   |    |
| IV.  | RESULTADOS  |    |
|      | Efecto fisiológico de las auxinas en la elongación de coleóptilos de mafz ..... | 47 |
|      | Determinación de peso fresco y seco de coleóptilos de mafz .....                | 47 |
|      | Extracción y purificación de ribosomas y proteínas ribosomales .....            | 49 |
|      | a) Rendimiento de Ribosomas   |    |
|      | b) Rendimiento de Proteínas Ribosomales   |    |

|  |    |
|--|----|
| Evaluación de la fosforilación de proteínas ribosomales .....                                | 53 |
| a) Toma de $^{32}\text{P}$ por los tejidos al inicio del ensayo                              |    |
| b) Incorporación de $^{32}\text{P}$ en las proteínas ribosomales de los coleóptilos de maíz. |    |
| c) Patrones Electroforéticos de Proteínas Ribosomales teñidos con azul de Coomassie.         |    |
| d) Determinación de pesos moleculares en geles de poliacrilamida-SDS.                        |    |
| e) Evaluación de las Autorradiografías   |    |
| Tablas .....   | 59 |
| Figuras .....  | 65 |
| <b>V. DISCUSION Y CONCLUSIONES</b>   |    |
| Discusión .....  | 73 |
| a) Efecto diferencial de las auxinas   |    |
| b) Fosforilación de proteínas ribosomales  |    |
| c) Modelo de acción de las auxinas   |    |
| Conclusiones .....   | 83 |
| <b>VI. BIBLIOGRAFIA</b>  |    |
| Bibliografía .....   | 85 |
| <b>VII. APENDICE</b>   |    |
| a) Tabla para el cálculo de proteínas por extinción a 260 y 280 nm .....                     | 94 |

## I. INTRODUCCIÓN

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las auxinas representan un grupo de reguladores del crecimiento vegetal que tienen varios efectos fisiológicos como la elongación de coleóptilos, fototropismo de tallo, inducción de callos, etc... y bioquímicos como la inducción de enzimas ATPasa, celulasa o alteraciones en la síntesis de RNA y proteínas.

Como consecuencia el patrón de proteínas sintetizadas en tejidos estimulados con auxinas se observan cambios: proteínas nuevas que se sintetizan y otras que dejan de hacerlo (3, 14 y 22).

Se ha identificado al ácido indol acético (AIA) como la auxina natural más abundante, aunque no la única, en los tejidos, de las plantas (14 y 53). Además, existen otras auxinas llamadas sintéticas como el ácido 2,4-dicloro fenoxiacético (2,4-D), el ácido 2-metil,4-cloro fenoxipropiónico (MCPP), el ácido naftalen acético (ANA), etc... que mimifican la acción de las auxinas nativas (19).

Se conoce que la acción de algunas hormonas se ejerce

por un mecanismo de fosforilación y desfosforilación de proteínas, esta información se tiene en base a estudios en organismos animales (12 y 53). Sin embargo, se postula que en plantas posiblemente existe este mismo mecanismo como parte de la forma de acción de los fitorreguladores. En apoyo a esto, existen reportes en tabaco, trigo, maíz y otras especies vegetales (22) que indican que algunas proteínas se fosforilan en respuesta a la acción de las auxinas (36).

Trabajos previos en este laboratorio han mostrado que las auxinas alteran la fosforilación de las proteínas ribosomales de ejes embrionarios de maíz (49). Este fenómeno ocurre sólo en los periodos avanzados de la germinación, por lo que parece estar ligado al estado de desarrollo de los tejidos. Dado que durante el desarrollo de la plántula la respuesta a las auxinas es más evidente en el coleóptilo, se decidió analizar el efecto de las auxinas en la fosforilación de las proteínas ribosomales de estos tejidos (50).



## HIPOTESIS DE TRABAJO

Por trabajos previos en el laboratorio (48,49 y 50), se conoce que las auxinas, hormonas vegetales, inducen la fosforilación / desfosforilación de protefnas ribosomales en ejes embrionarios de maiz.

Si el estimulo a la fosforilación de las protefnas ribosomales forma parte del mecanismo de acción de las auxinas, en los procesos metabólicos de las plantas que estas regulan, entonces:

- a) En los coleóptilos de maiz, que es uno de los tejidos blanco de las auxinas, debe observarse una mayor incorporación de ortofosfato -  $^{32}P$  en las protefnas ribosomales procedentes de ribosomas tratados con AIA o con MCPP, con respecto al control; como respuesta al efecto de las auxinas.
  
- b) Tanto el AIA, la auxina natural, como el MCPP, análogo del 2,4 D, que es una auxina sintética muy activa, mostrarán patrones electroforéticos semejantes de fosforilación.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto de las auxinas tanto la natural (AIA) como la sintética (MCP) en la fosforilación de las proteínas ribosomales de coleóptilos de maíz.

### OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Montaje de la técnica de obtención de proteínas ribosomales de coleóptilos de maíz.
- b) Determinar la técnica más adecuada de electroforesis para la separación de proteínas ribosomales de coleóptilos de maíz.
- c) Analizar los patrones electroforéticos teñidos con azul de Coomassie de las proteínas ribosomales de tejidos tratados y no tratados con auxinas.

- d) Por medio de pulsos de ortofosfato -<sup>32</sup>P. Evaluar el efecto de las auxinas en la fosforilación de las proteínas ribosomales de coleóptilos de maíz, a través de autorradiografías de los patrones electroforéticos de estas proteínas.

## I I. ANTECEDENTES

## AUXINAS

En las plantas superiores se han encontrado sustancias con una estructura química definida, denominadas fitohormonas o fitorreguladores que se producen en tejidos específicos. Para actuar pueden hacerlo en el mismo lugar de su producción o bien transportarse a otros sitios de acción. Estas sustancias a muy bajas concentraciones regulan diversos procesos fisiológicos, como son: crecimiento, elongación, división celular, etc... (40).

Se conocen cinco tipos de fitorreguladores que controlan el crecimiento y desarrollo de las plantas; esta clasificación se basa en su naturaleza química, así como en los efectos fisiológicos con los cuales se asocian estos compuestos. Los fitorreguladores son: giberelinas, citocininas, etileno, ácido abscísico y auxinas (3).

Los compuestos de interés para este estudio serán las auxinas que son sustancias caracterizadas por su capacidad de inducir elongación en los tejidos blanco. Se ha definido como tejido blanco a aquellos tejidos de la planta capaces de dar una respuesta a la aplicación exógena de un fitorregulador. Así el concepto de "sensibilidad" a auxinas implica la mayor

o menor intensidad de respuesta a auxinas (43). La auxina natural más ampliamente distribuida en el reino vegetal es el ácido indol acético (AIA), que fue la primera fitohormona descubierta y a la cual se le conoce como la hormona de la plasticidad.

Existen también auxinas de carácter sintético las cuales se caracterizan porque son generalmente compuestos ácidos con un núcleo cíclico insaturado o derivados de sus ácidos y además presentan uno o varios efectos fisiológicos característicos de las auxinas (40).

Darwin (14) fue el primero en estudiar el efecto fototrópico y de elongación en coleóptilos, así mismo, Salkowski y Salkowski aislaron el AIA, compuesto que fue identificado como el responsable del efecto fototrópico del coleóptilo por Went en 1928 (3 y 14).

Desde el descubrimiento y caracterización de la auxina, se han realizado un gran número de investigaciones relacionadas con la regulación del crecimiento en plantas. En la mayoría de los casos los compuestos utilizados como auxinas son de naturaleza sintética (14).

### Acido Indol Acético.

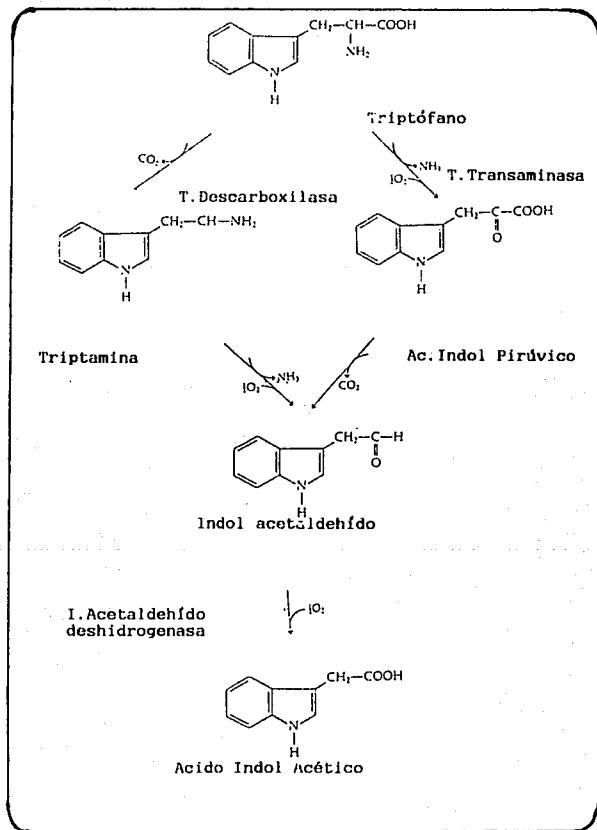
La producción de auxinas en las plantas se lleva a cabo a través de un proceso enzimático, que consiste en convertir el triptófano en AIA (8).

Gordon y Niewa proponen que el AIA puede sintetizarse vfa dos rutas distintas:

1. La desaminación del triptófano formando ácido indol pirúvico, seguido de una descarboxilación para formar indol acetaldehído o

2. Por la descarboxilación del triptófano para formar triptamina, seguida de una desaminación que origina indolacetaldehído. Este compuesto es considerado el precursor inmediato del AIA en las plantas (3).

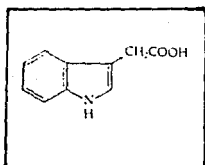
## BIOSINTESIS DEL AIA



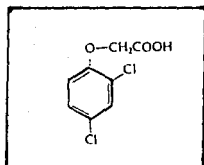


Después del aislamiento de la auxina natural comenzó una búsqueda intensa por encontrar compuestos químicamente similares al AIA y que tuvieran actividad de auxina (14). Así se encontraron sustancias con actividad similar al AIA, como los ácidos indol-3-butírico, indol-3-propiónico (3), fenoxiacético, naftalenacético, picolínico, 2,4 diclorofenoxiacético (2,4 -D) y el 2-metil,4-cloro,2-fenoxipropiónico (MCPP) y otros (14).

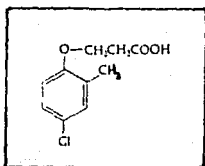
## ESTRUCTURA QUIMICA DE LAS AUXINAS



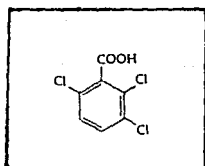
Acido Indol Acético  
(AIA)



Acido 2,4-clorofeno-  
xiacético (2,4-D)



Acido 2-metil-4-cloro  
fenoxipropiónico (MCP)



Acido 2,3,6-tricloro  
benzónico

## Distribución de la auxina en las plantas.

Las auxinas se encuentran en altas concentraciones en las extremidades en crecimiento de las plantas, es decir, en la punta del coleóptilo, de las hojas y raíces. La concentración de la auxina disminuye conforme se aleja del extremo a la base del coleóptilo (14).

Existen dos categorías generales de auxinas en plantas: Las auxinas libres, incluyendo las auxinas difusibles, y las auxinas ligadas que son aquellas que se obtienen de la planta sólo después de haber sido sujeta a hidrólisis, autólisis o enzimólisis (3).

## Efectos fisiológicos de las auxinas

Las auxinas tienen efectos muy diversos cuando se aplican exógenamente a plantas intactas, órganos aislados o células vegetales en cultivos (20).

Entre los efectos fisiológicos de las auxinas se observan:

1. Elongación de tallos, hojas y raíces
2. Diferenciación celular
3. Iniciación de la floración
4. Desarrollo y crecimiento del fruto
5. Abscisión de hojas, flores y frutos
6. Inducción de callos

Los efectos de las auxinas se dividen en dos categorías en función del tiempo de respuesta: las que ocurren rápidamente después de la exposición a la auxina que incluyen deformación y elongación de la pared celular, la cual se lleva a cabo en término de minutos (29) y las respuestas de largo plazo, que se llevan a cabo en horas, como son la división y la diferenciación celular (68).

#### Mecanismo de acción de auxinas

En la actualidad no se sabe con certeza si el mecanismo de acción de las auxinas se lleva a cabo vía un sólo sitio de acción primario o se generan a través de varios mecanismos paralelos (22).

Dado el interés de estos temas, se han estudiado mucho y se ha acumulado información muy preciada al respecto, de tal manera que en la actualidad se tiene un panorama más amplio del posible mecanismo de acción de las auxinas .

La primera hipótesis y la más estudiada es la denominada del "crecimiento ácido", dada por Raylen, Hager y Cleland (18 y 73) quienes propusieron que la elongación celular era provocada por la disminución del pH de la fase acuosa de la pared celular, posiblemente por la acción de una ATPasa localizada en la membrana, que actúa como bomba de protones. El incremento de  $H^+$  debilita los enlaces no

covalentes entre los polímeros de xiloglucanos y las microfibrillas de celulosa de la pared celular. La pared sería reestructurada por la síntesis de nuevo de sus componentes (9, 10 y 29).

Sin embargo, se ha encontrado que algunos hechos experimentales, no concuerdan totalmente con el modelo propuesto para esta primera hipótesis (2 y 67). Entre ellos: La síntesis de RNA y proteínas inducidas por auxinas es casi inmediata a su adición, mientras que las enzimas involucradas en la degradación y síntesis de la pared celular tienen un período de retraso en su aparición (67).

Más recientemente se ha enfocado la atención en el efecto de las auxinas a nivel molecular, dado que otras sustancias como fucosina y aún la simple acidificación del medio pueden mimificar el efecto de elongación del tejido blanco, al menos por un tiempo (29).

El patrón de proteínas sintetizadas en los tejidos estimulados, por la acción de las auxinas muestra cambios significativos: proteínas nuevas que inducen su síntesis, proteínas que dejan de sintetizarse y otras que modulan la velocidad de su síntesis. Este patrón de proteínas involucra una regulación tanto a nivel transcripcional (genes auxino-modulables), como traduccional (48,67 y 81).

El efecto a nivel molecular causado por la aplicación de auxinas, muestra así mismo, un incremento en la síntesis de RNA. Esta respuesta parece depender de dos enzimas diferentes, la RNA polimerasa I y II (23 y 36).

Los resultados de estos trabajos han generado otra hipótesis denominada : " Hipótesis de la expresión genética", la cual propone que las auxinas actúan en algún punto de la transcripción y posiblemente también de la traducción regulando la síntesis de polipéptidos en el proceso de crecimiento. Esta hipótesis fue postulada por Key y colaboradores (53).

Vanderhoef (72 y 73) integró ambas hipótesis en una sola. Propuso un mecanismo que implica dos tipos de efectos en el suceso: 1. De efecto inmediato que consiste en la excreción de  $H^+$  al medio, respuesta a corto plazo y 2. La regulación de la expresión genética a nivel transcripcional que es una respuesta a más largo plazo (10).

Con el fin de conocer el mecanismo de acción de las auxinas, a nivel molecular, se han seguido distintas aproximaciones experimentales entre las que se encuentran:

- a) El aislamiento y caracterización de los receptores de auxinas en los tejidos de respuesta (55).

b) El efecto de las auxinas en la regulación de la expresión genética en los tejidos de respuesta (73).

El descubrimiento de proteínas con alta afinidad por auxinas, posibles receptores partícipes de la acción de estas, ha generado una hipótesis que tiene como sustento el mecanismo de acción de ciertas hormonas animales (64). Los receptores al ser activados por el fitorregulador desencadenan una serie de eventos bioquímicos que llevan a la respuesta fisiológica observada (17).

La existencia de proteínas con alta afinidad para auxinas en diversos tejidos vegetales, podrían ser componentes de un sistema de transducción de señales conectadas con la expresión de la regulación genética (53 y 56).

## Segundos mensajeros en plantas

Todos los organismos vivos requieren de mecanismos de transmisión de señales del exterior al interior de la célula a fin de funcionar eficientemente. En modelos animales a la hormona se le llama mensajero a la señal intracelular se le llama segundo mensajero. En animales se han estudiado las bases bioquímicas de los sistemas de transducción de señales extracelulares y se han identificado varias sustancias que actúan como segundos mensajeros (mensajeros intracelulares) como el AMPc, Ca, inositol trifosfato, etc..., los cuales se han investigado también en plantas (59 y 60).

### AMP cíclico (AMPc)

La existencia de AMPc en plantas ha sido reportada por varios autores (59 y 60). Sin embargo, los métodos analíticos no han sido lo suficientemente sensibles para su completa identificación, aunque Brown y Newton reportan la aplicación de técnicas cromatográficas y electroforéticas para identificar AMPc en tejido de frijol. Además, Newton ha identificado al AMPc en plantas por medio de espectrometría de masas (41).

Más aún se han descrito enzimas involucradas en el metabolismo de AMPc. Así tenemos el caso de la



fosfodiesterasa de AMPc localizada en chicharo, papa, frijol, cebada y tabaco (6) y la adenilato ciclasa reportada en 1970 (52) localizada en membrana plasmática y retículo endoplásmico de chicharo (34).

#### **Calcio-calmodulina en plantas**

El calcio actúa como segundo mensajero en la transducción de señales extracelulares en algunas plantas (53). Para que el calcio funcione como mensajero intracelular es requisito que la concentración de calcio libre en el citoplasma esté regulada, con un nivel basal bajo que se incrementa en respuesta a los estímulos. Además se requiere que exista un mecanismo para detectar los cambios en la concentración de calcio y traducirlos en una respuesta fisiológica. Al respecto se sabe que el calcio puede actuar directamente o asociado con la calmodulina (26 y 58).

La calmodulina, proteína de peso molecular bajo, y universalmente distribuida en todos los organismos, se ha localizado en distintos compartimentos subcelulares como citoplasma, mitocondria, cloroplasto, núcleo, membranas, etc., mostrando propiedades biológicas y fisicoquímicas similares a las ya encontradas en otros organismos (43 a 46). El complejo calcio-calmodulina ejerce control en el transporte

de calcio, además participa en la regulación de proteínas cinasas y del metabolismo celular a través de fosforilación y desfosforilación de proteínas (53).

### **Fosforilación de proteínas en plantas**

La fosforilación-desfosforilación de proteínas es reconocido como un mecanismo regulatorio importante por el cual se alteran las actividades de enzimas reguladoras clave del metabolismo y moléculas receptoras dentro de la célula, en respuesta a un gran número de estímulos externos (12).

Las enzimas responsables de estos procesos (proteínas cinasas y protein fosfatasas) muestran alta especificidad por su sustrato (53) y se les considera como uno de los puntos más importantes en la amplificación y regulación de la señal transducida.

Entre las proteínas fosforiladas en plantas como respuesta a una señal se han reportado algunas proteínas ribosomales (7,61,62 y 79), factores de iniciación (7), proteínas nucleares (histonas y no histonas) (35 y 74 ), proteínas membranales (47 y 75), proteínas de cloroplasto y mitocondria (43), etc...

Se ha reportado que la actividad de algunas enzimas vegetales se regulan por fosforilación y desfosforilación como la quinato: NAD+ oxidoreductasa (57 y 54), la piruvato deshidrogenasa, la fosfoenolpiruvato carboxilasa (53) así como el de fitorreguladores como el fitocromo (78).

Algunos investigadores han encontrado que la acción de los fitorreguladores esta asociada con cambios en el estado de fosforilación de ciertas proteínas (53).

Así, se ha visto que las auxinas cambian los niveles de calcio en el citosol, alterando así las actividades de proteínas cinasas y/o fosfatasa y resultando en la modificación del estado de fosforilación observado en proteínas específicas (53).

Por otra parte se ha encontrado que algunas proteínas ribosomales cambian su estado de fosforilación en respuesta al choque de calor y a la adición de fitorreguladores exógenos como: auxinas, citocininas y ácido abscísico (61,62 y 79).

## RIBOSOMAS Y PROTEINAS RIBOSOMALES

Los ribosomas son organelos compuestos por ácido ribonucleico y proteínas, además son las máquinas moleculares en donde se llevan a cabo las interacciones entre tRNAs, mRNAs y proteínas en el complicado proceso de la síntesis proteica, (32).

El tamaño de los ribosomas es de acuerdo a los organismos eucarióticos (80S), en las bacterias o cloroplastos (70S) y en las mitocondrias (55S) (51).

Los ribosomas eucarióticos son mayores que los procarióticos. Constan de una subunidad grande de 60S y otra pequeña de 40S que se unen para formar una partícula de 80S, con una masa de 4200 kDa, comparada con los 2700 kDa del ribosoma procariótico de 70S. La subunidad 60S, con un diámetro aproximado de 23 nm, tiene un perfil triangular con dos lados convexos y uno más plano que presenta una depresión angosta, contiene además tres RNAs: Los RNAs de 5S y los de 28S son los equivalentes a las moléculas procarióticas 5S y 23S; su RNA de 5.8S es

característico de los eucariotes. La subunidad 40S es alargada y angosta, tiene un lado convexo y otro cóncavo, dividido en dos partes desiguales (15).

La subunidad 40S contiene un RNA de 18S homólogo del RNA procariótico de 16S (65). Entre ambas subunidades se forma un "túnel" que contiene el RNA mensajero. El tamaño de las subunidades varía algo entre animales y plantas, lo que también ocurre en el tamaño del RNA. Los ribosomas de las plantas contienen rRNAs de 25S y 18S y los ribosomas animales rRNAs de 28S y 18S (31).

En las células de eucariotes, algunos ribosomas están libres en el citosol, mientras que otros están unidos a un extenso sistema membranoso llamado retículo endoplásmico (ER) que abarca aproximadamente la mitad del total de la membrana de una célula. La región a la que se unen los ribosomas se llama ER-rugoso. Los ribosomas unidos a membranas sintetizan tres tipos principales de proteínas: proteínas lisosómicas, proteínas de secreción y proteínas que atraviesan la membrana plasmática. No se han detectado diferencias estructurales entre los ribosomas libres y los derivados del ER rugoso. Por consiguiente, los ribosomas unidos a membranas y los ribosomas libres se cree que son intrínsecamente los mismos. El que un ribosoma determinado

esté libre o unido al ER rugoso depende fundamentalmente de la clase de proteína que está sintetizando (65).

Los ribosomas se unen a la membrana del retículo endoplásmico por medio de la subunidad mayor. Aunque al menos algunas de las proteínas de los ribosomas tienen una función catalítica, la función específica del rRNA no está todavía clara aunque tiene centros de enlace para un número de proteínas ribosomales (13).

Las cuatro moléculas de rRNA antes mencionadas se forman por transcripción de dos genes separados uno de 120 bases, 5S que se transcribe en el núcleo. Los otros tres fragmentos se forman como un único producto de transcripción de 45S en el nucleolo celular. El procesamiento del precursor de 45S del rRNA comprende modificaciones covalentes, principalmente metilaciones, los pasos siguientes consisten en una serie de rupturas hidrolíticas las cuales forman los productos finales, que son las moléculas de rRNA 5.8S, 18S y 28S; que ya se habían mencionado (4).

Los segmentos terminados se pliegan sobre sí mismos resultando una estructura secundaria y terciaria compleja dependiendo de la interacción rRNA y las proteínas (32).

La subunidad 60S de los ribosomas eucariontes contiene RNAr 5S, 5.8S y 28S, con un número aproximado de 47 proteínas, la subunidad 40S con RNAr 18S, junto con unas 30 clases diferentes de proteínas (32).

Muchas de las proteínas ribosomales son modificadas por metilación o acetilación en la posición amino terminal o por metilación de residuos internos de lisina (65).

Algunos estudios muestran que la estructura secundaria de los RNAr proporciona una matriz para el agregado ordenado de las proteínas (65).

El ribosoma procarionte mejor estudiado ha sido el de E. Coli, el cual es una partícula ribonucleoprotéica con una masa de unos 2700 kDa, un diámetro de 200 Å y un coeficiente de sedimentación de 70S. Puede disociarse en una subunidad grande (50S) y otra pequeña (30S). Estas subunidades pueden además dividirse en sus proteínas y RNAs constituyentes. La subunidad 30S contiene veintiuna proteínas diferentes (numeradas desde S1 a S21) y una molécula de RNA de 16S. La subunidad de 50S contiene unas 34 proteínas distintas (numeradas desde L1 a L34) y dos moléculas de RNA, una de 23S y otra de 5S. Cada ribosoma contiene una copia de cada una de las moléculas de RNA, dos copias de las proteínas L7 y L12 y una

de las restantes. Los veinte mil ribosomas de una célula bacteriana constituyen la cuarta parte de su masa total (45 y 46).

El RNA constituye aproximadamente las dos terceras partes de la masa de estas grandes asociaciones moleculares. Los tres RNAs - 5S, 16S y 23S - son críticos para la estructura y función de los ribosomas. Un aspecto llamativo de estos RNAs es su plegamiento en estructuras definidas con muchas regiones duplohelicoidales cortas. Los patrones del apareamiento de bases de estas moléculas se han deducido mediante experimentos de modificaciones químicas y digestión y por comparación de las secuencias de nucleótidos de muchas especies de seres vivos, para descubrir las secuencias conservadas por la evolución (45 y 46).

El extremo 3' de los 16S RNA, un constituyente de la subunidad ribosómica 30S, juega un papel fundamental en seleccionar el punto de iniciación de la síntesis proteica sobre el mRNA molde, secuencias cercanas al codón de iniciación, AUG, participan en su reconocimiento (38), tal vez en el primer reconocimiento intervienen secuencias complementarias en el RNA ribosomal y los RNAs mensajeros (32). En procarotes estas corresponden a la secuencia Shine-Dalgarno (4).



Las moléculas de RNA ribosómico se forman por escisión de transcritos primarios 30S que contienen una ordenación en " tandem " de unidades 16S, 23S y 5S.

En cada transcrito hay uno o dos tRNAs situados entre los RNAs 16S y 23S y hasta dos tRNAs más pueden estar después del RNA 5S (65).

El RNA precursor se rompe por la ribonucleasa III en un fragmento pre-16S y otro pre-23S. La maduración subsiguiente tiene lugar después de que las proteínas ribosómicas se hayan unido a estos fragmentos (65).

La subunidad ribosómica 30S puede ser reconstituida a partir de una mezcla de RNA de 16S y de las veintiuna proteínas constituyentes. El reagrupamiento espontáneo de estos componentes para formar una subunidad 30S totalmente funcional fue realizado por primera vez, por Masayasu Nomura (1935). Varios años después se reconstituyó la subunidad 50S. El significado de estos experimentos es doble. Primero, demostraron que toda la información necesaria para el correcto ensamblaje de este organelo está contenida en la estructura de sus componentes. No fueron necesarios factores extrarribosómicos. Por tanto, la formación de un ribosoma "in vitro" es un proceso de autoensamblaje. Segundo, la reconstitución puede utilizarse para averiguar si un componente particular

Los estudios sobre la reconstitución de la subunidad 30S han demostrado que el RNA de 16S es esencial para su ensamblaje y su función. Para el ensamblaje son necesarias también la mayor parte de las 21 proteínas constituyentes, lo que significa que la subunidad 30S es una entidad funcionalmente cooperativa. El proceso de ensamblaje es secuencial y tiene lugar por etapas (46).

La determinación de las relaciones que existen entre la estructura y función de los ribosomas constituye un formidable desafío en la investigación, debido a su enorme tamaño (megadaltones). Todavía no se han obtenido cristales tridimensionales de los ribosomas perfectamente ordenados. Sin embargo, los investigadores están trazando la estructura global del ribosoma, su topografía superficial y la localización de sus proteínas y RNAs constituyentes. Este progreso es el resultado de la aplicación de una amplia gama de técnicas en diferentes laboratorios. La forma del ribosoma y de sus subunidades 30S y 50S se ha reconstruido a partir de un gran número de imágenes de microscopía electrónica.

La microscopía inmunoelectrónica, que utiliza anticuerpos específicos para proteínas determinadas, ha revelado la identidad de muchas zonas de la superficie. El centro de

unión del mRNA y el extremo 3' del RNA 16S están situados en una plataforma localizada entre la parte superior e inferior de la subunidad 30S. En una hendidura formada por esta plataforma y el tercio superior de la subunidad están los dos centros de unión de los tRNAs. La subunidad 50S posee tres protuberancias. El centro de la peptidiltransferasa que cataliza la formación del enlace peptídico está localizado en el valle entre dos de ellas, una proyección dactilar contiene el centro de la GTPasa que potencia el desplazamiento de los tRNAs y el mRNA. El lugar de salida de la cadena polipeptídica en crecimiento esta situado en el lado opuesto de la subunidad 50S (44,45,46 y 45).

Las localizaciones de cada una de las 21 proteínas de la subunidad 30S se han determinado por un análisis de difracción de neutrones de disoluciones concentradas. Se prefieren los neutrones a los rayos X porque las dispersiones de los neutrones producidas por el hidrógeno y el deuterio son muy diferentes (44).

Los ribosomas pueden prepararse y separarse sus subunidades. Estas partículas pueden desmontarse "*in vitro*" y purificarse el ARNr y las proteínas componentes; esto ha permitido el estudio del reensamblaje de las partículas (16).

La función biológica de los ribosomas es compleja e implica el reconocimiento y captación del mRNA, la unión de aminoacil-tRNAs específicos, la formación de enlaces peptídicos y la transposición física del ribosoma a lo largo del mRNA por un proceso mecanoquímico GTP dependiente, para decodificar el mensaje, lo que da como resultado la formación de las nuevas proteínas (proceso de traducción) (16,31 y 65).

### Significancia de la Fosforilación en Ribosomas.

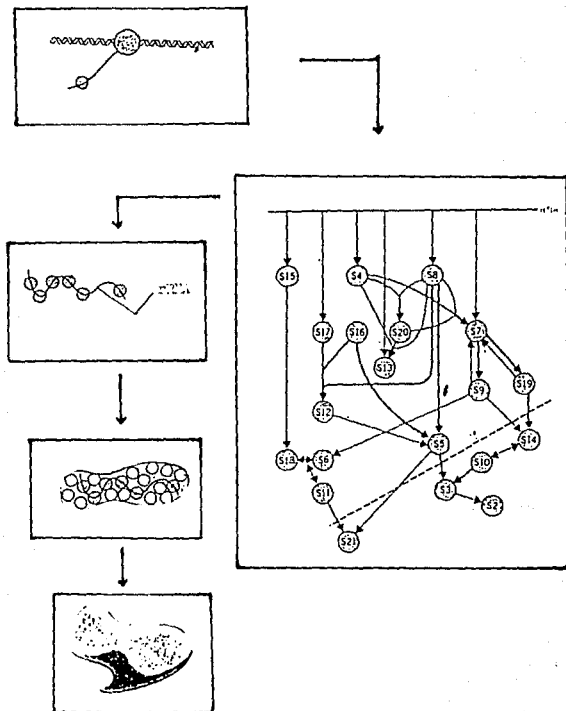
El primer reporte de fosforilación de componentes traduccionales ocurrió cuando Kabat (27) y Loeb (27) independientemente observaron la fosforilación de la subunidad 40S. Desde este momento se pensó en factores de iniciación, factores de elongación, tRNA-aminoacil sintetasas y proteínas ribosomales como posibles blancos de fosforilación (27). Se encontró que existía fosforilación en las proteínas ribosomales, tanto "*in vivo*" como "*in vitro*" implicando alguna modificación en el funcionamiento del ribosoma (5).

Se conoce que son varias las proteínas ribosomales que se fosforilan, sin embargo, existe una proteína ribosomal que se ha estudiado extensamente, esta es la S6. La fosforilación de esta proteína ocurre en respuesta a estímulos celulares. Se ha observado que la fosforilación de S6 se ve involucrada en:

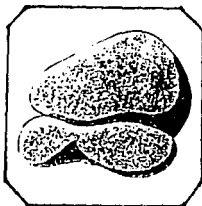
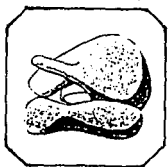
a) Una mayor síntesis de proteínas durante la maduración de huevos de *Xenopus* (42) y en células Swiss/3T3 de ratón (68), sugiriendo que la fosforilación de la subunidad 40S induce una regulación en la fase de iniciación de la síntesis de proteínas.

b) La fosforilación de la proteína S6 se ve aumentada por tratamiento con calor o adición de insulina, esto podría involucrar la activación de una u otra cinasa, cuyo sustrato sería S6 (61,62 y 69).

# ENSAMBLAJE DE LOS RIBOSOMAS



## ESTRUCTURA DE LOS RIBOSOMAS





### III. PARTE EXPERIMENTAL

## DISEÑO EXPERIMENTAL

Por trabajos previos en el laboratorio, se sabe que los niveles de auxina libre se incrementa en semillas de maíz durante la germinación (48).

Además se han obtenido evidencias de alteraciones en la fosforilación de algunas proteínas inducidas por la aplicación exógena de las auxinas (48) a ejes embrionarios de maíz. Entre las que se encuentran las proteínas ribosomales (49).

Dados estos antecedentes en el laboratorio se ha propuesto como hipótesis general de trabajo que las auxinas alteran la fosforilación de las proteínas ribosomales, produciendo cambios conformacionales en los ribosomas que podrían alterar el proceso de la síntesis proteica.

Dentro de este marco general y para cumplir con los objetivos propuestos en este trabajo se propone el siguiente diseño experimental:

a) Selección del material biológico. En primer término se seleccionaron las semillas de maíz, que no estuvieran contaminadas con bacterias y hongos, ya que si desde un principio van contaminadas el proceso de germinación se retrasa y el vigor de la planta en crecimiento se deteriora. Las semillas

se incubaron durante 5 días tiempo durante el cual se alcanza la longitud adecuada del coleóptilo para el experimento, se corta la zona apical 3mm por ser esta la región región donde se produce naturalmente la auxina y se toma a partir de allí 1 cm de tejido por ser esta región muy responsiva a la acción de auxinas.

b) Aplicación exógena de auxinas a los segmentos de coleóptilos de maíz. Se eligió el AIA por ser esta una auxina natural y el MCPP una auxina sintética eficiente en tejidos de maíz (48) y poder así observar si los efectos que producen ambas auxinas son semejantes.

c) Observación del efecto de fosforilación por medio de pulsos de ortofosfato -  $^{32}\text{P}$ . Los segmentos de coleóptilos se incubaron en presencia de auxinas durante 23 horas y durante una hora se dió el pulso de ortofosfato -  $^{32}\text{P}$ . Este pulso que se aplicó durante una hora, tiempo suficiente para poder observar el efecto de la fosforilación.

e) Para analizar el efecto de las auxinas sobre las proteínas ribosomales se realizaron geles de poliacrilamida - SDS de una dimensión y autorradiografía para tener en una sola placa los tres sistemas probados: control, estimulado con AIA o con MCPP. Esto permite la comparación entre ellos.

## MATERIAL

### a) Equipo

Balanza Sartorius, potenciómetro Methrom Ltd Mod. E300, autoclave Wisconsin stereo 25X, campana de flujo laminar Clean Beach, vortex Genie, centrifuga Beckman J2-21, ultra-centrifuga Internacional IEC, microfuga Beckman Mod.B, incubadora, equipos de electroforesis de Bio-Farm, espectrofotómetro Beckman, ultracongelador Bio Freezer Scientific, balanza Chyo JP-3000W.

### b) Reactivos

Los reactivos utilizados son de grado reactivo analítico de las compañías: Merck y Sigma.

### c) Material Biológico

Se utilizaron semillas de maíz (*Zea mays* L.) variedad Chalqueño, cosecha 1989.

## METODOLOGIA

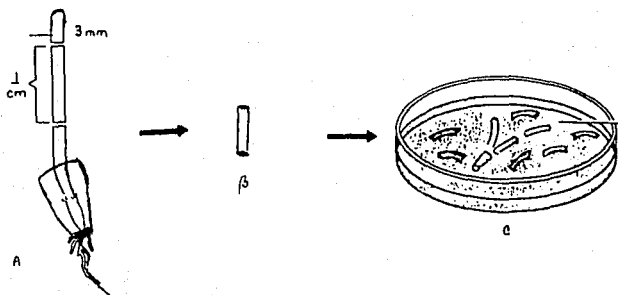
### a) Preparación del material biológico.

De acuerdo a Devlin y Bewley (3 y 14).

1. Se utilizaron semillas de maíz (*Zea mays* L.) variedad Chalqueño, para cada experimento.
2. Selección de semillas, no contaminadas con hongos ni bacterias, ni manchadas ni deterioradas.
3. Se tomaron las semillas y se repartieron en grupos de 65 semillas por frasco de Gerber.
4. Se esterilizaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 10%, 15 minutos y se enjuagaron con agua desionizada y estéril 1 o 2 veces. Se dejaron en agua y en la oscuridad por 5 horas.
5. Se esterilizaron las palanganas con hipoclorito de sodio al 10%, 15 minutos y se enjuagaron con agua desionizada y estéril 3 veces.
6. Las semillas se sembraron en las palanganas, sobre un soporte de agrolita estéril y se cubrieron con egapack.
7. Durante 5 días las palanganas se mantuvieron en la oscuridad a una temperatura de 25°C.
8. Se cosecharon las plantas a los 5 días de desarrollo.

9. Se midieron los coleóptilos y se eligieron aquellos que tuvieran una longitud de 2.1 a 3.1 cm.
10. Se diseccionaron los coleóptilos elegidos, se eliminaron los 3 mm apicales y a partir de allí, se tomó 1 cm de tejido. Se eliminó la hoja primaria.
11. Se lavó el tejido con agua estéril y desionizada, durante 1 ó 2 horas en la oscuridad.
12. Los fragmentos se secaron ligeramente y se pesaron, posteriormente se incubaron en agua (control) o en presencia de las auxinas AIA o MCP, a una concentración de  $1 \times 10^{-6}$  M a 25°C durante 23 h, se secaron y pesaron.

## PREPARACION DE MATERIAL BIOLÓGICO.



- (A). Semilla germinada durante 5 días, mostrando las partes que la componen.
- (B). Segmentos de coleóptilos de 1cm, sin hoja primaria.
- (C). Segmentos de coleóptilos incubados con auxina (tratamiento) o sin ella (control).

b) Pulsos de ortofosfato -<sup>32</sup>P

Los coleóptilos tratados como se indicó en el inciso a, se colocaron tres sistemas, cada uno con 65 coleóptilos, que pesaron aproximadamente 2.3 g de peso fresco, los cuales fueron tratados con auxinas o sin ellas (control), con 450 µl de la solución que contenía la auxina a una concentración de  $1 \times 10^{-6}$  M y 150 µl de ortofosfato -<sup>32</sup>P a una concentración de 300 µCi/µl. Los coleóptilos se incubaron durante una hora a 25 °C, en baño de agua. Se enjuagaron para quitar toda la radioactividad inespecífica, se secaron ligeramente y se congelaron para la extracción de ribosomas.



### c) Extracción y cálculo de rendimiento de ribosomas

#### Obtención de ribosomas.

El procedimiento de aislamiento de ribosomas utilizado está basado en el método de Siegmann y Thomas (68).

Los coleóptilos fueron macerados en N líquido hasta lograr un polvo fino, se le adicionaron 2 volúmenes de buffer de extracción (Tris.HCl 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM, KCl 20mM, NaF 5mM, 2-mercaptoetanol 0.5%, Tritón X-100 1%, Sacarosa 0.25M,  $\beta$ -glicerofosfato 80 mM y PMSF 1mM, pH 7.8 ). El beta-glicerofosfato se utiliza para inhibir la acción de las protein fosfatasa, lo que contribuye a tener una mejor separación de las proteínas. Se homogeinizó en el mortero hasta que se logró una pasta blanda y se centrifugó en la centrifuga J2-21 Beckman 15 minutos a 15,000 rpm y 4°C. El sobrenadante se filtró por miracloth y el filtrado se centrifugó en la centrifuga Beckman J2-21 a 15,000 rpm durante 20 minutos a 4 °C, el sobrenadante que se obtuvo se colocó sobre 2.5 ml de colchón de sacarosa (Sacarosa 0.5 M y KCl 0.5 M en buffer de extracción).

Se centrifugó en una Beckman, rotor 75 Ti, donde los ribosomas se sedimentaron después de 4h a 52,000 rpm y a una temperatura de 0-2°C.

El sedimento que se obtuvo se resuspendió en el mínimo volumen del buffer de resuspensión (Hepes 20 mM, KOH 20 mM, Acetato de Mg 5 mM, Acetato de K 125 mM y 2-mercaptoetanol 6mM, pH 7.6), con una concentración de 8.0 D.O. /ml.

#### Calculo de rendimiento de ribosomas

Para determinar el rendimiento de los ribosomas se tomó una alícuota de 5 µl de los ribosomas resuspendidos y se colocó en una celda de cuarzo de 1ml, como blanco se utilizó una alícuota de 5 µl de buffer de resuspensión, a ambos se les agregó 1 ml de agua. Se leyó la absorbancia a 260 nm y la lectura se multiplicó por 200 por ser esta la dilución utilizada. El resultado es el rendimiento de ribosomas en D.O. a 260 nm/ml. Este resultado se multiplicó por el volumen total en el que se resuspendió la muestra, para obtener el rendimiento total.

#### d) Obtención y cálculo de rendimiento de Protefnas Ribosomales

##### Obtención de Protefnas Ribosomales.

Los ribosomas se precipitaron y centrifugaron a 7,000 rpm en la centrifuga J2-21 Beckman 10 minutos a 0 °C. Se descartó el sobrenadante y se secó con vacfo. Los ribosomas se resuspendieron en el mínimo volumen posible del buffer de resuspensión.

Se añadió 0.1 volúmenes de acetato de Mg 1 M y lentamente dos volúmenes de ácido acético glacial, se agitó en baño de hielo continuamente durante 45 minutos. La mezcla se centrifugó en una centrifuga J2-21 Beckman a 10,000 rpm, 10 minutos a una temperatura de 0-2°C. Al sobrenadante se le agregaron 5 volúmenes de acetona a -20°C, se dejó 10 minutos después de los cuales se agitó y se dejó a -20°C durante toda la noche.

##### Calculo de rendimiento de protefnas ribosomales

Para determinar el rendimiento de las protefnas ribosomales se tomó una alícuota de 5 µl de las protefnas ribosomales resuspendidos y se colocaron en una celda de cuarzo de 1 ml, como blanco se utilizó una alícuota de 5 µl de buffer de resuspensión, a ambos se les agregó 1 ml de agua. Se leyó

la absorbancia a 280 nm y la lectura se multiplicó por 200 por ser esta la dilución utilizada. El resultado fue el rendimiento de proteínas ribosomales en D.O. a 280 nm/ml. Este resultado se multiplicó por el volumen total en el que se resuspendió la muestra, para obtener el rendimiento total.

### e) Geles de Poliacrilamida en Primera Dimensión

Para el análisis de las proteínas ribosomales tanto tratadas como sin tratar con auxinas, se utilizó electroforesis en gel de poliacrilamida siguiendo el método de Laemmli (30), con algunas modificaciones.

La muestra se mezcló con 2 volúmenes de amortiguador de muestra (Tris- HCl 62.5 mM, SDS 2.3%, glicerol 10%, 2-mercaptoetanol 5%, urea 8M y azul de bromofenol, pH 6.8).

Cada muestra de proteínas ribosomales, tratamientos y control se colocaron en carriles distintos de la placa del gel de poliacrilamida- SDS y en un carril adyacente a estos se colocaron los marcadores de peso molecular (conocidos).

El gel utilizado, contiene un gel separador de 16% de acrilamida y un gel apilador o concentrador de 12% de acrilamida, se corrió a 80 V durante 12h. enfriado con circulación de agua y hielo. Una vez terminada la electroforesis y efectuada la corrida se tiñó el gel con azul de Coomassie (azul de Coomassie R250 al 0.2% (p/v), en metanol 30% (v/v), y ácido acético 7% (v/v)) durante 45 minutos, se destiñó con una solución desteñidora (ácido acético 7% (v/v) y metanol 30% (v/v)).

#### f) Autorradiografía

Los geles después de la electroforesis se secaron, en un secador de geles de Bio-Rad, colocando los geles en un pedazo de papel filtro húmedo, se secaron durante 3 horas después de las cuales se expusieron con película para Rayos-X, durante 7 días después de los cuales se revelaron y se observaron.

#### IV. RESULTADOS

En el presente trabajo se estudió el efecto de la auxina natural AIA y una auxina sintética MCPP, análoga del 2,4 - D, sobre un parámetro bioquímico: La fosforilación de proteínas ribosomales.

#### Efecto fisiológico de elongación

Es bien conocido el efecto fisiológico de las auxinas que es el de inducir la elongación sobre el coleóptilo de maíz. Los resultados de los bioensayos realizados, muestran el cambio fisiológico de elongación, ya esperado. Así de una manera cualitativa se vio que en presencia de la auxina AIA el coleóptilo se elonga más y es más ancho que cuando se adiciona exógenamente el MCPP y ambos se encuentran más elongados que el control sin tratar con auxinas.

#### Determinación de peso seco y fresco de coleóptilos de maíz.

Una muestra de 65 coleóptilos, previamente pesados, se incubaron a 25°C durante 23h, para cada uno de los tratamientos AIA, MCPP y el control. Al final del período, se les eliminó el exceso de agua y se pesaron nuevamente, para obtener de esta manera el peso fresco.

En cuanto al peso seco, el mismo grupo de coleóptilos, se llevó a peso constante, en estufa a 60 °C. Es importante



hacer notar en este punto que no se tiene un valor de peso seco inicial, ya que este correspondió al peso inicial de peso fresco.

Los valores obtenidos para el peso fresco, después de pesar los coleóptilos incubados con y sin auxinas, no presentaban variaciones significativas entre sí, es por esto que se compararon los incrementos, obtenidos al final del experimento al restar al peso fresco de coleóptilos tratados -AIA o MCPP- el valor del control y se tomó el valor del control como el 100%, así puede verse que el efecto de la auxina natural AIA sobre el peso fresco del coleóptilo es 2.7 veces mayor que el del control y el MCPP es 1.9 veces mayor también que el control (Figura 1). En relación al peso seco también se encontró un incremento; este fue de 1.6 veces más que el control en presencia de auxina AIA y sólo de 1.11 veces mayor que el control con MCPP (Figura 2).

Se puede observar que tanto la diferencia en el peso fresco como en el peso seco, es mayor para la auxina natural, AIA, que el que presenta la auxina sintética, MCPP.

A partir de los datos que se obtuvieron, podemos inferir que: La diferencia observada en el peso fresco de los coleóptilos tratados con auxina natural, AIA y con la sintética MCPP con respecto al control estuvo dada preferentemente por el contenido de agua que presentó en los coleóptilos

inducida por la presencia de la auxina. En cambio la variación observada en el peso seco entre los coleóptilos tratados con auxinas natural y sintética y el control, probablemente está siendo proporcionada por la diferencia en el contenido de macromoléculas como carbohidratos, lípidos y proteínas, en los coleóptilos; siendo mayor la cantidad de esta clase de biomoléculas en los coleóptilos tratados con AIA que con MCPP y ambos mayor que el control que no se trató con auxinas.

En las figuras 1 y 2 pueden apreciarse en su conjunto estos resultados.

#### Extracción y purificación de ribosomas

Como uno de los objetivos de este trabajo experimental fue el montaje de la técnica de obtención de proteínas ribosomales a partir de coleóptilos de maíz. Se exponen dos tablas, referentes a la obtención de ribosomas y de proteínas ribosomales, la primera de ellas muestra el rendimiento logrado en la obtención de ribosomas (Tabla 2) y la segunda corresponde al rendimiento de las proteínas ribosomales (Tabla 4).

La tabla 2 muestra los valores obtenidos en cada experimento realizado, desde el inicio del montaje de la técnica de extracción y purificación. En un principio se

comenzó con grandes cantidades de tejido la cual se fue disminuyendo ya que por cuestión metodológica era difícil el marcado posterior, pero mostraron una tendencia a incrementar su purificación. Estos valores fueron muy variados. Esto consideramos que dependió: a) Al principio del desarrollo de este trabajo no se había estandarizado el peso para cada uno de los grupos de coleóptilos usados en los ensayos, b) La molienda se realiza a mano en mortero y por tanto es difícil reproducir la intensidad de la misma, c) la obtención de ribosomas se hizo en dos diferentes ultracentrifugas Beckman y la IEC con rotores 75Ti y el tipo A 321 de IEC respectivamente. Uno de columpio y el otro de ángulo fijo, lo cual proporciona una sedimentación distinta.

Las lecturas de las fracciones con ribosomas se realizaron a 260 nm, ya que es ésta la longitud de onda a la cual absorben las bases nucleotídicas que componen al rRNA. Estas moléculas sólo corresponden a las 2/3 partes del ribosoma, la otra tercera parte restante está formada por las proteínas ribosomales. Sin embargo es posible usar el parámetro de absorbancia a 260 nm para dar una indicación de la cantidad relativa de ribosomas que se obtienen por gramo de coleóptilo.

Es importante determinar si se está trabajando con ribosomas y que tan puros están, una de las formas de hacerlo es tomar la relación de absorbancia a 260 nm / 280 nm, ya que este cociente considera la absorbancia debida a las bases nitrogenadas (260 nm) tanto como a la de las proteínas en base a su contenido de aminoácidos aromáticos que corresponden a la fracción dada por la absorbancia a 280 nm.

En la tabla 3 se muestran los valores obtenidos de esta relación para los distintos experimentos que se realizaron . Se conoce que la relación 260 nm / 280 nm, para ribosomas de células de ratón, que corresponden a un organismo eucariote, es de 1.63 (51). Los valores que se obtuvieron para los ribosomas extraídos de coleóptilos de maíz con las metodologías descritas fueron alrededor de 1.67, por lo que se puede considerar que los ribosomas de células eucariotes de plantas superiores son similares a los de ribosomas de células eucariotes animales. Para algunos experimentos la pureza observada no fue tan buena ya que se obtuvieron relaciones (260 /280) de 1.45. Por reportes en la literatura (51) se sabe que un valor de 1.4, en la relación(260 /280 ), en ribosomas de células de ratón indican un contenido de 20% más de proteínas (51). Por lo tanto, nuestros datos indicarían que en las extracciones en las que se obtuvieron valores aproximados a 1.4, se estaba eliminando parte del RNA, o dejando contamina-

ción de otras proteínas, tal vez por no haberse eliminado totalmente factores protéicos del proceso de traducción. Esto ocurrió en las primeras purificaciones que se realizaron, posteriormente, cuando se dominó mejor la metodología, los valores de pureza se vieron incrementados (Tabla 3).

#### Rendimiento de Proteínas Ribosomales.

Para definir el rendimiento de las proteínas ribosomales, se determinó la absorbancia de la porción protéica obtenida a 280 nm, ya que como se mencionó anteriormente, los anillos aromáticos de los aminoácidos como son fenilalanina, tirosina y triptófano, contienen electrones pi ( $\pi$ ), lo que les capacita para interactuar con otros sistemas pi y permite que exista una deslocalización electrónica.

Al utilizar la relación 280 nm / 260 nm, inversa a la de la que se utiliza para determinar la pureza de ribosomas, que nos indica el porcentaje de ácidos nucleicos, en este caso sería una contaminación de las proteínas ribosomales en la muestra; se puede calcular el rendimiento de las proteínas ribosomales, aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Factor X Relación } 280 / 260 = \text{mg de proteína} / \text{ml.}$$

Donde el "factor" se refiere a un valor determinado por la relación observada en el contenido de los ácidos nucleicos, la tabla aparece en el anexo (77). Tomando en cuenta los volúmenes totales y los factores de dilución se obtuvieron los resultados reportados en la tabla 5. Los valores muestran una alta variación entre los rendimientos, esto como consecuencia de la experiencia en el manejo de las metodologías que implican cierto grado de complejidad. Esta interpretación se refuerza si se observa el grado de pureza con la que se obtuvieron las proteínas, el cual fue aumentando progresivamente en los experimentos finales (Tabla 4).

Un punto que hay que hacer notar es que como a la longitud de onda de 280 nm, también se encuentran absorbiendo parte del RNA estas determinaciones de proteínas no son totalmente concluyentes, sin embargo, representan un acercamiento útil para los fines de este trabajo. En el caso de querer tener valores más precisos, habría que hacer una cuantificación de las proteínas purificadas, teniendo como patrón primario proteínas ribosomales de coleóptilos de maíz y utilizando métodos colorimétricos para la determinación de proteínas.

#### Evaluación de la fosforilación de proteínas ribosomales.

El efecto de las auxinas AIA y MCPP sobre la

fosforilación de las proteínas ribosomales de los coleóptilos de maíz, se evaluó aplicando pulsos de ortofosfato-  $P$ , a los coleóptilos en la última hora de incubación, de las 23 a las 24 horas.

La presencia de diversas proteín-cinasas, ya previamente descritas en otras células eucariotes (25) son las responsables de fosforilar proteínas, en este caso las proteínas ribosomales en posiciones específicas formando enlaces de tipo éster entre el ortofosfato- $^{32}P$  y los residuos oxhidrilos de aminoácidos como treonina, serina y en algunos casos no tan comunes, de tirosina (37).

En los experimentos que se realizaron con este propósito, la cantidad de radioactividad en el medio de incubación, con la que se iniciaron los tres distintos experimentos - AIA, MCPP y Control-, fue la misma. La toma del ortofosfato en los tejidos mostró una cantidad muy semejante de  $P$ , para los tres grupos en estudio (Tabla 5). Esto indica que las auxinas no están alterando el transporte del ortofosfato-  $P$ , a través de la membrana al interior de las células y que por lo tanto alteraciones en la incorporación de fosfato radiactivo a las proteínas ribosomales será reflejo del efecto de las auxinas en los tejidos.

La tabla 6 se refiere a la incorporación de P en las proteínas de los diferentes ribosomas (AIA, MCPP y control). Es necesario considerar que los valores expresados no corresponden estrictamente a la velocidad total de incorporación de fosfatos marcados radioactivamente en el tejido sino que es una medida del recambio de la fosforilación, ya que el fosfato- $^{32}\text{P}$  podría fosforilar posiciones disponibles en las proteínas ribosomales o estarse intercambiando en sitios ya ocupados por fosfatos no marcados radiactivamente, ya que también existen en las células de los tejidos proteín-fosfatasas activas que desfosforilan dichas proteínas.

Bajo esta consideración podemos hablar de que hay una mayor "incorporación" de  $^{32}\text{P}$  en los ribosomas que fueron tratados con la auxina AIA que con los tratados con la auxina sintética MCPP y ambos mayor que el control (al cual no se le adicionó ningún tipo de auxina), siendo la incorporación de P en ribosomas tratados con AIA de un 428% y la de los ribosomas tratados con MCPP de 145%, considerando al control como 100%, según puede apreciarse en los resultados que aparecen en la tabla correspondiente (Tabla 5).

El siguiente paso consistió en examinar el efecto de las auxinas, tanto la natural como la sintética, que corresponden al AIA y al MCPP, sobre el patrón electroforético de



las proteínas ribosomales y a través de la autorradiografía observar el tipo de proteínas ribosomales de los coleóptilos de maíz, que mostrarían la banda indicativa de incorporación del ortofosfato-<sup>32</sup>P .

Para este fin se hicieron corridas de electroforesis en placa en una dimensión, las cuales permitían observar simultáneamente las proteínas ribosomales provenientes de los tres tipos de muestras, AIA, control y MCPP. Se corrieron también patrones de proteínas estándar de peso molecular conocido, en un rango de peso molecular de 14,000 kD, correspondiente a la lactoalbúmina, hasta 66,000 kD que corresponde a la albúmina bovina (reactivo de Sigma) con objeto de poder determinar los pesos moleculares de las proteínas que mostrarían fosforilación marcada con ortofosfato-<sup>32</sup>P.

La curva patrón de pesos moleculares, se obtuvo a partir de los pesos moleculares de los estándares a los cuales se les calculó el logaritmo y el cual fue graficado en las ordenadas y en las abscisas se graficó el Rf que corresponde a la distancia recorrida por la proteína problema dividida por la distancia recorrida por el colorante, en este caso, donde se deja que el colorante salga, se toma como distancia el tamaño total del gel.

### Patrones Electroforéticos de Proteínas ribosomales

Los patrones de proteínas ribosomales de los tres tipos de ribosomas -AIA, control y MCPP- teñidos con azul de Coomassie son muy similares y no se observan alteraciones significativas en las proteínas de los tres tipos de ribosomas (Figura 6).

Esto de alguna forma se esperaba ya que en este tipo de patrón vemos las proteínas que están constituyendo los ribosomas y éstas no tendrían por que ser distintas si todas provienen de ribosomas de coleóptilos, a menos que el tratamiento con auxinas hubiera tenido un efecto sobre el tipo de las proteínas que forman al ribosoma, el cual no se observa en este tipo de ensayo.

### Análisis de las Autorradiografías.

Se evaluó el efecto de las auxinas AIA y MCPP sobre la fosforilación en las proteínas ribosomales de los coleóptilos de raíz por medio de la autorradiografía; el análisis de las bandas marcadas presentes en la autorradiografía (Figura 8) muestra:

Que los patrones de fosforilación de las proteínas ribosomales son muy semejantes en los tres casos, ya que tanto en el control como con los diferentes tratamientos (AIA y MCPP) se observan siete bandas fosforiladas que corresponden a los siguientes pesos moleculares 59.1, 55.9, 50, 42, 39.7, 35.1 y 28 kD. Las proteínas que aparecen más intensamente fosforiladas en los tres ensayos son las de 50, 42 y 28 kD.

Sin embargo, la intensidad con la que se muestran las bandas es diferente para cada uno de los tratamientos utilizados, mostrando las bandas fosforiladas correspondientes al tratamiento de AIA una mayor intensidad que las observadas en la autorradiografía correspondiente a las proteínas ribosomales tratadas con MCPP y ambas mayor que el control.

Con la adición de la auxina natural, AIA, se presentan las siete bandas que se presentan fosforiladas en el control, pero además aparece una banda fosforilada que corresponde a la proteína ribosomal de 31.9 kD de peso molecular, que no aparece ni en el control ni en presencia de MCPP.

## T A B L A S

Tabla 1.

Determinación de peso fresco y peso seco de coleóptilos de maíz.

| Muestra | Peso fresco (g) | Peso seco (g)                 |
|---------|-----------------|-------------------------------|
| Control | 0.149 ± 0.010   | 0.0052 ± 1.8X10 <sup>-4</sup> |
| AIA     | 0.400 ± 0.028   | 0.0083 ± 2.0X10 <sup>-4</sup> |
| MCPFP   | 0.287 ± 0.013   | 0.0058 ± 2.1X10 <sup>-4</sup> |

Los coleóptilos utilizados (65 por cada tratamiento), se incubaron durante cinco días en la oscuridad a 25 °C, pasado este período de tiempo se determinó el peso fresco inicial. Se incubaron durante 23 horas con auxina y sin ella, después de la incubación se obtuvo el valor final del peso fresco, estos coleóptilos se llevaron a peso constante a 60 °C y se determinó el peso seco. Los datos reportados corresponden al incremento en el peso obtenido entre el peso fresco final y el inicial. Los valores de peso seco son los que se lograron a peso constante. Los valores son las medias de cinco ensayos + los valores de D.S. La concentración de auxinas - AIA y MCPFP - en ambos casos fue de  $1 \times 10^{-6}$  M.

Tabla 2.

Rendimiento de Ribosomas

| No. de experimento | DO <sub>260</sub> | Rendimiento (DO <sub>260</sub> /ml) | Rendimiento (DO <sub>260</sub> /g p.fr.) |
|--------------------|-------------------|-------------------------------------|--|
| 1                  | 0.094±0.03        | 7.7± 1.11                           | 0.06±0.07                                |
| 2                  | 0.354±0.18        | 60.4± 3.58                          | 1.27±0.29                                |
| 3                  | 0.632±0.48        | 117.8±10.35                         | 1.88±0.18                                |
| 4                  | 0.648±0.26        | 49.6± 2.32                          | 3.43±0.71                                |
| 5                  | 0.913±0.38        | 70.8± 6.75                          | 6.25±0.91                                |

Los ccleóptilos utilizados para esta serie de experimentos (aproximadamente 1100 en cada uno), se incubaron durante cinco días a 25°C, después de los cuales se extrajeron los ribosomas y se obtuvo su rendimiento, determinando su absorbancia a 260 nm. Cada uno de los valores reportados corresponden a la media de 5 experimentos cada uno, ± la D.S.

Tabla 3.

Criterio de Pureza

| No. de experimento | D.O. <sub>260</sub> | D.O. <sub>260</sub> | Relación 260/280 |
|--------------------|---------------------|---------------------|------------------|
| 1                  | 0.094±0.03          | 0.064±0.02          | 1.45             |
| 2                  | 0.354±0.18          | 0.244±0.18          | 1.45             |
| 3                  | 0.632±0.48          | 0.378±0.22          | 1.67             |
| 4                  | 0.648±0.26          | 0.390±0.19          | 1.66             |
| 5                  | 0.913±0.38          | 0.546±0.20          | 1.67             |

Ribosomas obtenidos de segmentos de coleóptilos de maíz tratados con auxinas -AIA y MCPP- y un control sin auxinas. Para las mediciones se tomó una alícuota de 5 µl de cada uno de los tratamientos y se determinó su absorbancia a 260 y 280 nm. Los valores corresponden, cada uno de ellos, a la media de cinco ensayos realizados ± D.S.

Tabla 4.

Rendimiento de Proteínas Ribosomales

| No. de Experimento | A <sub>280</sub> | Relación 280/260 | Rendimiento mgP.Rb/gtejfr. |
|--------------------|------------------|------------------|----------------------------|
| 4                  | 0.53±0.20        | 0.59±0.13        | 6.57±0.94                  |
| 3                  | 0.42±0.17        | 0.65±0.18        | 4.78±0.91                  |
| 2                  | 0.38±0.15        | 0.69±0.19        | 3.40±0.85                  |
| 1                  | 0.25±0.11        | 0.80±0.25        | 3.30±0.80                  |

Se extrajeron las proteínas ribosomales de los coleóptilos de maíz por el método de Thomas, (69), se tomaron alícuotas de 5 µl y se leyeron a 260 y 280 nm. Cada valor representado corresponde a la media de 6 purificaciones de proteínas ribosomales, ± la D.S.



Tabla 5 .

Efecto de las auxinas en la incorporación de  $^{32}\text{P}$   
 en coleóptilos de maíz.

| Tratamiento | cpm/D.O. | %de Incorporación $^{32}\text{P}$ |
|-------------|----------|-----------------------------------|
| CONTROL     | 2,990    | 100                               |
| AIA         | 12,782   | 428                               |
| MCPP        | 4,317    | 145                               |

Los valores de la tabla anterior corresponden al promedio del experimento realizado por triplicado. Se incubaron 130 coleóptilos por cada tratamiento. Se dió un pulso de ortofosfato  $^{-32}\text{P}$  de una hora. Se obtuvieron las proteínas ribosomales, se tomó una alícuota de 10  $\mu\text{l}$ . y se contó en el contador de centelleo.

Tabla 6 .

Curva Patrón de Peso Molecular en geles de  
Poliacrilamida.

| Proteína                                    | Peso Molecular | log PM | Rf   |
|---|----------------|--------|------|
| Lactoalbúmina                               | 14,200         | 4.15   | 0.87 |
| Inh. tripsina de soya                       | 20,100         | 4.30   | 0.72 |
| Tripsinógeno                                | 24,000         | 4.38   | 0.66 |
| Anhidrasa carbónica de eritrocito de bovino | 29,000         | 4.46   | 0.60 |
| Gliceraldehído-3-P deshidrogenasa           | 36,000         | 4.55   | 0.46 |
| Albúmina de huevo                           | 45,000         | 4.65   | 0.38 |
| Albúmina bovina                             | 66,000         | 4.84   | 0.25 |

Los valores que aquí se reportan, es un ejemplo de como se determinaron los pesos moleculares, ya que para cada uno de los experimentos hechos se tiene su gráfica. Los valores de la tabla se obtuvieron graficando el logaritmo de los pesos moleculares conocidos vs. el Rf.

**F I G U R A S**

## PESO FRESCO

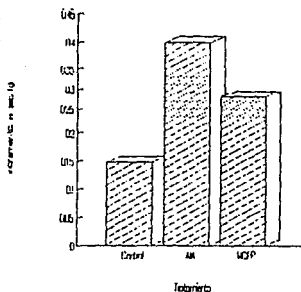


Figura 1.

Variación en el peso fresco en coleóptilos de maíz. Se tomaron 65 coleóptilos, y se determinó el peso fresco inicial de cada uno de los tratamientos (AIA o MCPP) y un control (agua), incubados con y sin auxinas a 25 °C, durante 23h, después de las cuales se determinó el peso fresco final. Se obtuvo el incremento de peso fresco (peso final - peso inicial). Los resultados corresponden a la media de cinco experimentos.

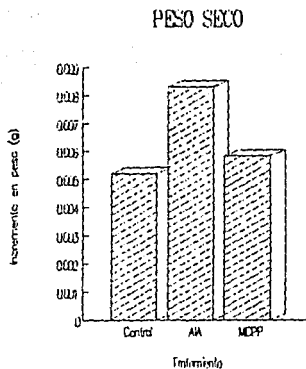


Figura 2.

Variación en el peso seco en coleóptilos de maíz. Se tomaron 65 coleóptilos de cada uno de los tratamientos -AIA o MCPP - y un control (agua), incubados a 25 °C, durante 23 h, se llevaron a peso seco. Los valores corresponden a la media de cinco experimentos  $\pm$  su D.S..

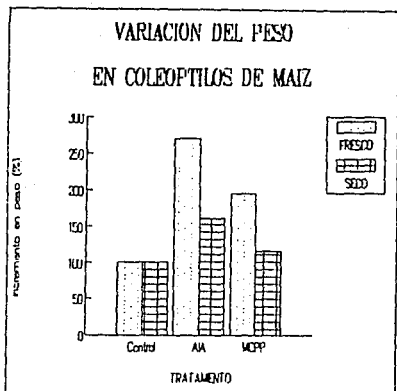


Figura 7.

Variación en el peso fresco y seco en coleóptilos de maíz. Se tomaron 65 coleóptilos de cada uno de los tratamientos - AIA, control y MCPP - incubados a 25°C, durante 23 h, se determinó peso seco y peso fresco. Los resultados proporcionados se refieren a la media de cinco experimentos, expresados en porcentaje en relación al control, que se tomó como 100%.

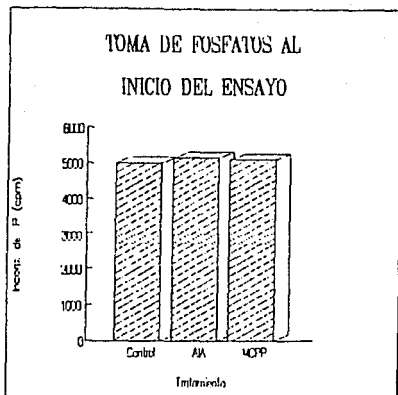


Figura 4.

Toma de ortofosfato -  $^{32}$ P al inicio del ensayo. Se incubó 2.3 g de peso fresco de coleóptilos de maíz, para cada uno de los tratamientos, en una solución de agua con auxina o sin ella, se dió un pulso de P durante una hora. los coleóptilos se procesaron y se obtuvieron de ahí las proteínas ribosomales, se tomó una alícuota de 10  $\mu$ l y se contó en el contador de centelleo.

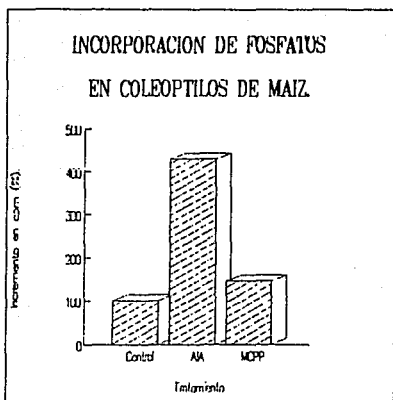


Figura 5. Variación en el % de incorporación de  $^{32}\text{P}$ , en las proteínas ribosomales. De cada uno de los tratamientos -AIA, control y MCPP- se tomó una alícuota de 10  $\mu\text{l}$  de las proteínas ribosomales y se leyeron en un contador de centelleo.



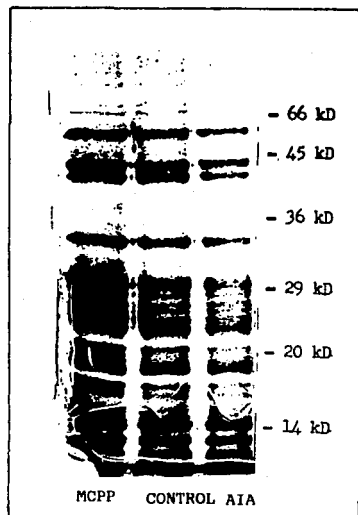


Figura 6 .

Patrón electroforético en una dimensión de proteínas ribosomales de coleóptilos de maíz. Se separaron de acuerdo a la técnica de Laemmli(30). Tefidas con azul de Coomassie Las concentraciones utilizadas son distintas en contenido protéico ya que se igualaron por contenido de radioactividad, para efectos de la autorradiografía.

CURVA DE PESOS MOLECULARES

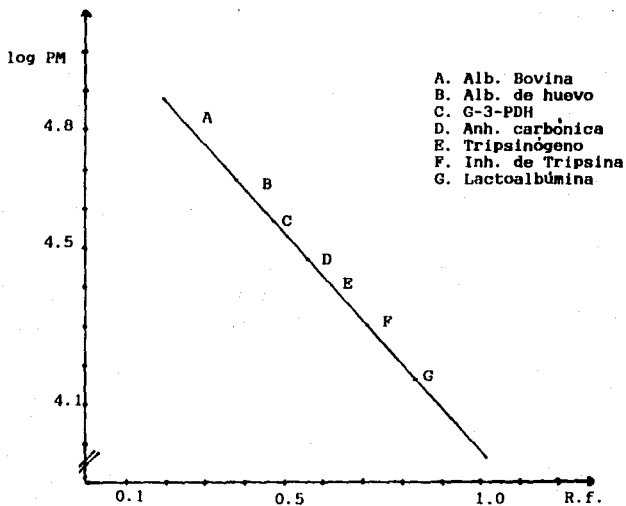


Figura 7 .

Curva Patrón : Mezcla de proteínas patrón corridas en electroforesis. La gráfica se realizó utilizando los valores obtenidos del logaritmo de los pesos moleculares conocidos y el Rf se obtuvo por la fórmula:  $Rf = \frac{\text{distancia recorrida por la proteína problema}}{\text{distancia recorrida por el colorante}}$ . A partir de estos valores se calculó el peso molecular de proteínas problemas.

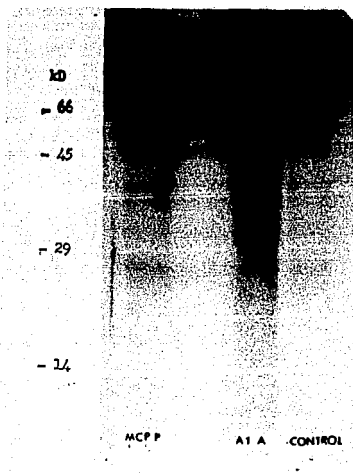


Figura 8.

Autorradiografía del patrón electroforético en una dimensión de proteínas ribosomales de coleóptilos de maíz. Se distinguen los carriles que muestran las bandas fosforiladas cuando se trataron (carril AIA y MCPP) y el control. La cantidad de marca en cada carril es la misma. La placa se expuso durante 14 días.

## V. DISCUSSION Y CONCLUSIONES

Esta sección referente a la discusión la he dividido principalmente en dos partes:

A) El efecto diferencial de las auxinas

B) La fosforilación de las proteínas ribosomales

que corresponden a la argumentación de las hipótesis propuestas al comienzo de este trabajo.

Al final de esta sección se propone un posible mecanismo de la acción de las auxinas, tomando como base el mecanismo propuesto para la acción de hormonas animales, específicamente las hormonas esteroides.

## EFECTO DIFERENCIAL DE LAS AUXINAS

Aunque ambas auxinas (AIA y MCPP) utilizadas durante el desarrollo de los experimentos, se consideran fitohormonas y comparten el efecto fisiológico de elongación de los tejidos, su mecanismo de acción no parece ser idéntico.

La afirmación anterior se basa en las observaciones de los resultados que se obtuvieron durante la realización de este trabajo. Así de manera cualitativa se observó que los fragmentos de coleóptilos tratados con AIA o MCPP, se elongaban más y eran más anchos que el control. Sin embargo, al analizar los datos de la tabla 1, que corresponden a la variación de peso fresco, y en especial los de la tabla 2, del peso seco, se observa que los fragmentos de coleóptilos tratados con AIA mostraron mayores incrementos que los tratados con MCPP.

Esto corrobora que las auxinas (AIA y MCPP), muestran efectos comunes, cuando son aplicados exógenamente, como son: la elongación del coleóptilo y el aumento de peso seco y fresco, sin embargo, en la intensidad del efecto se observan aspectos diferenciales.

Esto probablemente indicaría que ambas auxinas actuarían compartiendo el mismo proceso de elongación, como

sería la acidificación del medio, el debilitamiento de los enlaces no covalentes entre los xiloglucanos y las microfibrillas de celulosa de la pared celular (5). Como consecuencia se facilitaría la entrada de agua y explicaría el aumento de peso fresco y la elongación de los fragmentos de coleóptilos. Sin embargo, en ciertos aspectos a nivel bioquímico de fenómeno probablemente difieren. Tal vez en estimular la producción de algunas biomoléculas del tipo de las proteínas, carbohidratos, lípidos u otros metabolitos que contribuyen a incrementar el peso seco del tejido.

En la literatura se encuentran reportes de sustancias que aunque no son propiamente auxinas, también generan elongación de los coleóptilos y sin embargo muestran diferencias a nivel bioquímico en la forma de acción con relación a las auxinas. Así se tienen reportes de Zocchi, que confirman el hecho de que la acción de las auxinas puede ser mimificada por otras sustancias, como es el caso de la fucosina (80) o la alta concentración de protones en el medio (71). Esto no debe llevarnos a pensar que todas las sustancias que comparten algunos efectos fisiológicos se comporten molecularmente de la misma manera.

En efecto, la fucosina, que es una toxina fúngica, mimifica el efecto de elongación de los coleóptilos en forma

similar a la acción del AIA. Aunque la auxina y la fucosina, al igual que el AIA y el MCPP en nuestro caso, aumentan la elongación de los coleóptilos, el efecto metabólico de ambas sustancias probablemente es distinto. De acuerdo a experimentos realizados por Zocchi, los coleóptilos tratados con AIA reducen la marca radiactiva de ortofosfato marcado incorporada en la fracción fosfolipídica de sus tejidos, en cambio los coleóptilos tratados con fucosina, no modifican el nivel de fosfatidilinositol (PI) con respecto a su control.

Así mismo los patrones de fosforilación de las proteínas ribosomales del coleóptilo (Fig.8), nos hacen pensar que aun las llamadas auxinas sintéticas como la utilizada en este trabajo, presenta algunas diferencias a este nivel con relación a la acción de la auxina natural, el AIA.

Esto significa que las auxinas tienen un efecto más complejo y que la simple elongación, es tal vez sólo una de las consecuencias de su acción a nivel molecular.

Así los resultados obtenidos en este trabajo ratifican la hipótesis propuesta referente a la mayor incorporación de ortofosfato marcado en las proteínas ribosomales que fueron obtenidos a partir de coleóptilos tratados con auxinas, aunque su mecanismo molecular difiera con ambas auxinas, la natural AIA y la sintética MCPP.



## FOSFORILACION DE PROTEINAS RIBOSOMALES

Los experimentos que se realizaron fueron diseñados para profundizar en el conocimiento del efecto de las auxinas en un tejido blanco de maíz. Este sistema permitió además comparar la respuesta del coleóptilo hacia la auxina natural AIA y a una auxina sintética (MCP); todo ello usando como parámetro de referencia la fosforilación de las proteínas ribosomales.

Dado que la fosforilación - defosforilación de proteínas es una de las modificaciones covalentes que permite tener control de varias rutas metabólicas (12), se podría pensar que la fosforilación de las proteínas ribosomales estuviera relacionada con una modificación en la estructura del ribosoma y ésta a su vez tuviera como consecuencia alteraciones en el proceso de traducción.

Esta suposición se apoya en que se ha visto en otros organismos que la velocidad de traducción de las proteínas se relaciona con la fosforilación de algunas proteínas ribosomales (79).

Al aplicar exógenamente la auxina natural AIA o la sintética, el MCP, a los coleóptilos de maíz, los patrones de proteínas ribosomales no presentaron cambios significati-

vos en su estado de fosforilación (Fig.8); en donde se confirma la hipótesis referente a que los patrones de fosforilación de proteínas fueran semejantes cualitativamente. Sin embargo, los cambios que se observaron fueron en primer lugar de tipo cuantitativo pues se incrementó la fosforilación de las proteínas ya marcadas con respecto al control. Es importante hacer resaltar que no todas las bandas fueron igualmente incrementadas lo que puede sugerir, además un efecto específico y cualitativo.

Existen reportes de algunos trabajos en la literatura, los cuales indican la importancia de la fosforilación de las proteínas ribosomales en diferentes sistemas. La fosforilación de la proteína ribosomal S6 ha sido una de las más estudiadas por el papel regulador que se le ha asignado. Se conoce que la proteína ribosomal S6 se fosforila en respuesta a choque de calor (60), aplicación de insulina y factores de crecimiento (49). La proteína ribosomal S6, es una proteína que se encuentra en la subunidad pequeña del ribosoma, de 11 kD de peso molecular y que está involucrada en la etapa de formación del factor de iniciación en la síntesis de proteínas (5 y 69). En nuestro caso encontramos una proteína ribosomal que estimula su fosforilación, cuando se trata con la auxina AIA (Fig.8,AIA), de aproximadamente 31.5 kD de peso molecular. Tomando como base solamente el

# ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

peso molecular, podemos sugerir que al igual que en animales, probablemente esté involucrada en la regulación durante la etapa de iniciación de la síntesis de proteínas.

Se conoce la existencia de la fosforilación de otro tipo de proteínas ribosomales importantes en la regulación del mecanismo de transcripción como son las proteínas L7/L12 de E. coli (82) y otros sistemas como levaduras o células animales (83 y 84).

Se debe considerar que durante este trabajo se utilizó para la comparación de los procesos de fosforilación, geles de poliacrilamida en una dimensión, y lo que se observa como una banda no necesariamente corresponde a una sola proteína sino que podría corresponder a más de una proteína.

Por esta razón, sería necesario realizar una electroforesis en segunda dimensión y por medio de esta determinar si las diferencias observadas fueran cuantitativas, es decir, mayor número de ribosomas están siendo fosforilados en sus patrones o bien sólo cualitativas. Así las diferencias cualitativas en la fosforilación podrían relacionarse con: a) una fosforilación preferencial por ciertas proteínas ribosomales, b) una sobrefosforilación de alguna(s) proteína(s) o c) un intercambio de fosfatos más rápido en alguna(s) de las posiciones posibles a ser fosforiladas.

## MODELO DE ACCION DE LAS AUXINAS

El modelo que a continuación se expone esta basado en el modo de acción de hormonas animales.

La hormona como primer paso se introduce a la célula a través de la membrana citoplasmática por medio de moléculas transportadoras específicas que se presentan en la membrana citoplasmática, este tipo de moléculas difunden a través de todas las células pero sólo encuentran un receptor específico, de elevada afinidad, en los tejidos blanco. Una vez unida la hormona al receptor específico, el complejo hormona-receptor experimentan una reacción de " activación ", que corresponde a un cambio conformacional, provocando la fosforilación de algún o algunos aminoácidos de la cadena peptídica. El complejo hormona-receptor podría unirse a regiones específicas del DNA, afectando de manera selectiva la transcripción de genes y la producción de los mRNAs respectivos. Esto trae como consecuencia cambios en las cantidades de proteínas específicas y así son influidos diversos procesos metabólicos. Al activarse o desactivarse genes específicos, se codifica para enzimas protein-quinasas o para protein-fosfatases específicas, que estén actuando a nivel de fosforilación/desfosforilación de proteínas a nivel postraducciona l o bien de fosforilación /desfosforilación de proteínas que actúan a

nivel de síntesis de proteínas como serían factores de iniciación, zonas de reconocimiento del RNAm en los ribosomas, o que para ensamblarse los ribosomas fueran necesarias fosforilaciones en determinadas proteínas ribosomales, ... Tomando como base que las plantas presentan proteínas fosforilables y desfosforilables, receptores, presencia de segundos mensajeros, etc... Probablemente el mecanismo de las fitohormonas AIA y el MCPP sea semejante al modelo establecido para los animales, aunque las reacciones que destacan en la transducción de señales no generen idénticos niveles de intensidad en cada uno de los pasos, lo que podría explicar las diferencias observadas.

## CONCLUSIONES

Este trabajo es una pequeña aproximación al entendimiento de la acción de las auxinas, en un tejido blanco como lo es el coleóptilo el cual muestra un patrón de fosforilación distinto al observado con el que procede de las proteínas ribosomales de ejes embrionarios de 3 y 24 horas de germinación (Datos de Alma Pérez); sugiriendo que estas diferencias reflejan una especificidad de tejido y de estado de desarrollo.

Este estudio para consolidarse necesita estudios más profundos y específicos, como sería: a) la caracterización de las enzimas cinasas y fosfatasa responsables de la fosforilación de las proteínas ribosomales, b) el efecto en la velocidad y/o selección del mensaje por los ribosomas fosforilados, c) la regulación de este efecto en los diversos estados de desarrollo de la planta, etc...

Por otra parte queda por aclarar la identificación más precisa de las proteínas ribosomales capaces de fosforilarse, su posición en la estructura del ribosoma y aún su función en el proceso de traducción.

Estos temas son otros tantos proyectos de investigación sobre los que se requiere continuar trabajando a fin de contribuir al conocimiento de los mecanismos que regulan la germinación de las semillas y el establecimiento de las nuevas plántulas.



## V I .      B I B L I O G R A F I A

## VI. BIBLIOGRAFIA

1. Bailey-Serres, J. and Freeling, M. (1990). Hypoxi stress-induced changes in ribosomes of maize seedling roots. *Plant Physiol.* 94: 1237-1243.
2. Baulcombe, D. and Key, J. (1980). Polyadenylated RNA sequences which are reduced in concentration following auxin, treatment of soybean hypocotils *J. Biol. Chem.* 255:8907-8913.
3. Bewley, J.D. and Black, M. (1986). *Seeds & Physiology of Development and Germination.* Plenum N.Y. ISBN 0-306-41687-5.
4. Boer, H., Vassar, M. and Hui, A. (1986) Specialized ribosomes: directing ribosomes to a single mRNA species in *E. coli*. Mathews, MD (ed) *Translational control. Current Communications in Molecular Biology.* Cold Spring Harbor N.Y. pp 130-138.
5. Brown, E. and Newton, R. (1981). Cyclic AMP and higher plants. *Phytochem.* 20: 2453-2463.
6. Browning, K., Yan, t., Lauer, S., Aquino, L., Tao, M. and Ravel, J. (1985). Phosphorylation of wheat germ initiation factors and ribosomal proteins. *Plant Physiol.* 77:370-373.
7. Caruso, J.L. (1987). The auxin conjugates. *Hort Science.* 22(6): 1201-1204.
8. Cleland, R. (1976). Kinetics of hormone-induced H<sup>+</sup> excretion. *Plant Physiol.* 58:210-213.
9. Cleland, R. and Rayle, B. (1978). Auxin H<sup>+</sup> excretion and cell elongation. *Bot. Mag Tokyo Special Issue* 1:125-139.

10. Cleland, R. and Rayle, B. (1970). Auxin H<sup>+</sup> excretion and cell elongation. *Dot. Mag. Tokyo*. Issue 1:125-139.
11. Cocucci, M. and Negrini, N. (1988). Changes in the levels of Calmodulin and Calmodulin inhibitor in the early phases of radish (Raphanus sativus) seed germination. *Plant Physiol.* 88:910-914.
12. Cohen, P. (1985). The role of protein phosphorylation in the hormonal control of enzyme activity. *Eur. J. Biochem.* 151: 429-448.
13. Dahlberg (1989). The functional role of ribosomal RNA in protein synthesis. *Cell* 57: 525-529.
14. Devlin & Withman, (1987). *Plant Physiology* 4th. Edition Willard Grant Press, Boston PWS Publishers USA. Pp 344-362 ISBN 0-87150-765-X.
15. Eisenberg, H. (1987). Life at the end of ribosome tunnel. *TIBS* 12:207-208.
16. Engelman, D.M. and Moore, D.B. (1986). Neutron scattering studies of the ribosome. *Sci. Amer.* 235:43-54
17. Gantt, J. and Key, J.L. (1985). Coordinate expression of ribosomal protein mRNAs following auxin treatment of soybean hypocotils. *J. Biol. Chem.* 260:6175-6181.
18. Gantt, J.S. and Thompson, M.D. (1990). Plant Cytosolic ribosomal protein S11 and chloroplast ribosomal protein S17. *The J. of Biol. Chem.* 265:2763-2767.
19. Goodwin, T.W. and Mercar, I.E. (1983). *Introduction to Plant Biochemistry*. 2nd. Ed. Pergamon Press Ltd. Oxford and New York. pp 22-46. ISBN 0-444-80052-0.

20. Goodwin, P.B. (1978). Phytohormones on growth and development of the vegetative plant. Phytohormones and Related Compounds. A Comprehensive Treatise, Vol. 2 Cap 2 (Letham, D.S., Goodwin, P.B. and Higgings, T.J.V. eds) Elsevier/North Holland Biomedical Press New York pp 60 ISBN 284678-0.
21. Gregory, J., Boulton, T., and Sang, B. (1989). An Insulin-stimulated ribosomal protein S6 kinase from rabbit liver. J. of Biol. Chem. 264(31): 18397-18401.
22. Guilfoyle, T. (1986). Auxin-regulated gene expression in higher plants. CRC Critical Reviews In Plant Sciences. 4:247-276
23. Guilfoyle, T.J. (1980). Auxin induced deoxyribonucleic acid dependent ribonucleic acid polymerase activities in mature hypocotyl. Biochemistry 19:6112-6118.
24. Hames, B.D. and Rickwood, B. (1986). Gel electrophoresis of proteins. IRL-Press. Oxford-Washington, D.C. Cap. 1 y 5. ISBN 0-904147-22-3.
25. Hatakeyama, Kaufmann, Schroeter and Hatakeyama. (1989). Primary structure of five ribosomal proteins from the archaeobacterium *Halobacterium marismortui* and their structural relationships to eubacterial and eukaryotic ribosomal proteins. Eur. J. Biochem. 185:685-693.
26. Hepler, P. and Wayne, R. (1985) Calcium and plant development. Ann. Rev. Plant. Physiol. 36:397-439.

27. Hershey, J. (1989). Protein phosphorylation controls translation rates *J. Biol. Chem.* 264 (35): 20823-20826.
28. Jacobs, W.P. (1979). *Plant development*. Cambridge University Press. Cambridge, London. New York. pp 61-109. ISBN 0-521-22062-9.
29. Jacobs, M. and Ray, P.M. (1976). Rapid auxin-induced decrease in free space pH and its relationship to auxin-induced growth in maize and pea. *Plant Physiol.* 58:203-209
30. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
31. Lehninger, A. (1982). *Bioquímica*. 2a. ed. Omega, Barcelona, España. ISBN 0-8053-6103-0.
32. Lewin, B. (1985). *Genes*. 2nd. ed. John Wiley and sons. N.York. ISBN 0-471-80789-3.
33. Lukas, T. Iverson, D., Schleicher, M & Watterson, D. (1984) Structural characterization of a higher plant calmodulin ~~Spinacea oleracea~~. *Plant Physiol.* 75: 788-795.
34. Marmé, D. and Dieter, P. (1983). Role of calcium and calmodulin in plantas. *Calcium and cell Function Vol. IV*. Cheung, W ed. Academic Press New York. pp 263-311.
35. Melanson, D. and Trewavas, A.J. (1982). Changes in tissue protein pattern in relation to auxin induction of DNA synthesis. *Plant and Cell Environ.* 5:53-64.

36. Miassod, R., Got, C. and Torreton, J. (1984). Immunological estimation of changes in the absolute amounts of nuclear RNA polymerases in strictly auxin-requiring cultured soybean cells upon addition of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Planta* 162:434-439.
37. Michot and Bahellerie. (1990). Evolution of large subunit rRNA structure. *Eur. J. Biochem.* 188:219-229.
38. Moldave, K. (1985). Eukaryotic protein synthesis. *Ann. Rev. Biochem.* 54:1109-1149.
39. Monteiro, A.M., Crozier and Sandberg, G. (1988). The biosynthesis and conjugation of indole-3-acetic acid in germinating seed and seedlings of *Dalbergia dolichopetala*. *Planta* 174:561-568.
40. Moore, T.C. (1979). Auxins. In: *Biochemistry and Physiology of Plant Hormones*. Cap.2. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg and New York. pp 32-89. ISBN 0-387-90401-8.
41. Newton, R., Gibbs, N., Moyle, C., Wiebers, J. and Brown, E. (1980). Mass spectrometric identification of adenosine 3',5' cyclic monophosphate isolated from a higher plant tissue. *Phytochem.* 19:1909-1913.
42. Nielsen, P.J., Thomas, B. and Maller, J. (1982). Increased phosphorylation of ribosomal protein S6 during meiotic maturation of *Xenopus* oocytes. *PNAS* 79:2937-2941.
43. Nissen, P. (1985). Dose responses of auxins. *Plant Physiology*. 65:357-374.
44. Noller, H.F. (1984). Structure of ribosomal RNA. *Ann. Rev. Biochem.* 53:119-162.

45. Nomura, M., Gourse, R. and Bauchman, G. (1984). Regulation of the synthesis of ribosomal components. *Ann. Rev. Biochem.* 53:75-117.
46. Nomura, M., Gourse, R. and Bauchman, G. (1984). Regulation of the synthesis of ribosomal components. *Ann. Rev. Biochem.* 53: 118-129.
47. Paliyath, G. and Poovaiah, B. (1985). Calcium and calmodulin promoted phosphorylation of membrane proteins during senescence in apples. *Plant. Cell Physiol.* 26:977-986.
48. Pérez, L. Aguilar, R. and Sánchez de Jiménez E. (1987). Effect of exogenous auxin on maize tissues. Alteration of protein synthesis and phosphorilation. *Physiol. Plantarum* 69:517-522.
49. Pérez, L. (1988). Mecanismo de acción de auxinas en maíz. Tesis doctoral. Facultad de Química, U.N.A.M.
50. Pérez, L., Aguilar, R., Pérez Méndez, A. and Sánchez de Jiménez E. (1990). Phosphorylation of ribosomal proteins induced by auxins in maize embryonic tissues. *Plant Physiol.* 94: 1270-1275.
51. Petermann, M. (1964). *The Physical and Chemical Properties of Ribosomes.* Cap. 6. Elsevier Publishing Co. N.York. ISBN 64-18523.
52. Pollard, C. (1970) Influence of GA on the incorporation of B- C adenine into cAMP in barley aleurone layer. *Biochim. Biophys. Acta* 201:511-517.

53. Poovaiah, B.W. (1987). Calcium messenger system: Role of protein phosphorylation and inositol biphospholipids. *Physiol. Plantarum* 69:569-573.
54. Ranjeva, R., Refeno, G., Boudet, A. and Marmé, D. (1983) Activation of plant quinate: NAD<sup>+</sup> oxidoreductase by Ca and calmodulin. *PNAS* 80: 5222-5224.
55. Ray, P.M., Dohrman, U. and Hertel, R. (1977). Specificity of auxin binding sites during the growth of batch cultured tobacco cells. *Planta* 152:415-419.
56. Ray, P., Dohrman, U. and Hertel, R. (1977). Specificity of auxin binding sites on maize coleoptile membranes as possible receptor sites for auxin actions. *Plant Physiol.* 60:585-591.
57. Refeno, G., Ranjeva, R. and Boudet, A. (1982). Modulation of quinate: NAD<sup>+</sup> oxidoreductase activity through reversible phosphorylation in carrot cell suspensions. *Planta* 154:193-198.
58. Roux, S., Wayne, R. and Datta, N. (1986). Role of calcium ions in phytochrome response: an update. *Physiol. Plantarum* 66:344-348.
59. Salomon, D. and Mascarenhas, J. (1971). Auxin induced synthesis of cyclic 3',5' adenosine monophosphate in *avena* coleoptiles. *Life Sci.* 10:879-885.
60. Salomon, D. and Mascarenhas, J. (1972). The time course of synthesis of cyclic AMP in *avena* coleoptiles sections in response to auxin. *Plant Physiol.* 49:25-30.



61. Schar, F.K. and Nover, L. (1982). Heat shock induced alterations of ribosomal protein phosphorylation in plant cell cultures. *Cell* 30:427-437.
63. Schleicher, M., Lukas, T and Watterson, D. (1983). Further characterization of calmodulin from barley (Hordeum vulgare). *Plant Physiol.* 73:666-670.
64. Sibley, D., Benovic, J., Caron, M. & Lefkowitz, R. (1987). Regulation of transmembrane signaling by receptor phosphorylation. *Cell* 48:913-922.
65. Stryer, Lubert. (1988). *Biochemistry*. Cap. 30. W.H. Freeman & Co. New York. ISBN -07167-1920-7.
66. Theologis, A. (1986). Rapid gene regulation by auxin. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 37:1303-1308.
67. Thiman, K.V. (1969). The auxins. In: *The Physiology of Plant Growth and Development*. Wilkins, M.B. ed. Mc. Graw-Hill. New York. pp 2-45. ISBN 0-87023-224-X
68. Thomas, G., Siegmann, M., Kubler, A., Gordon, J. and Jimenez de Asua, L. (1980). Regulation of 40S ribosomal protein phosphorylation in Swiss Mouse 3T3 cells. *Cell* 19:1015-1023.
69. Thomas, G., Martin-Pérez, J., Siegmann, M. and Otto, A. (1982). The Effect of serum, EGF, PGF & Insulin on S6 phosphorylation and the initiation of protein & DNA synthesis. *Cell* 30: 235-242.
71. Trewavas, A. and Cleland, R. (1983). Is plant development regulated by changes in the concentration of growth substances? *TIBS* 10:354-357.

80. Zocchi, G. (1990). Comparison of the effect of indoleacetic acid and fusicochin on the breakdown of phosphatidilinositol in Maize coleoptiles. *Plant physiology* 94:1009-1011.
81. Zurflush, L. and Guilfoyle, T. (1982). Auxin induced changes in the population of translatable mRNA in elongating maize coleoptile sections. *Planta* 156:525-527.
82. Gressner, A.M. and Wool, I.G. (1974). *J. Biol. Chem.* 249:6917-6925.
83. Zinker, S. and Warner J. (1976). the Ribosomal Proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 251:1799-1807.
84. MacConnell, W.P. and Kaplan, N.O. (1982). The Activity of the acidic phosphoproteins from the B0S rat liver ribosome. *J. Biol. Chem.* 257: 5359-5366.

## VII. APENDICE

| $E_{260}/E_{280}$ | Nucleic acid (%)† | Factor |
|-------------------|-------------------|--------|
| 1.75              | 0                 | 1.118  |
| 1.60              | 0.30              | 1.078  |
| 1.50              | 0.56              | 1.047  |
| 1.40              | 0.87              | 1.011  |
| 1.30              | 1.26              | 0.969  |
| 1.25              | 1.49              | 0.946  |
| 1.20              | 1.75              | 0.921  |
| 1.15              | 2.05              | 0.893  |
| 1.10              | 2.4               | 0.863  |
| 1.05              | 2.8               | 0.831  |
| 1.00              | 3.3               | 0.794  |
| 0.96              | 3.7               | 0.763  |
| 0.92              | 4.3               | 0.728  |
| 0.90              | 4.6               | 0.710  |
| 0.88              | 4.9               | 0.691  |
| 0.86              | 5.2               | 0.671  |
| 0.84              | 5.6               | 0.650  |
| 0.82              | 6.1               | 0.628  |
| 0.80              | 6.6               | 0.605  |
| 0.78              | 7.1               | 0.581  |
| 0.76              | 7.8               | 0.555  |
| 0.74              | 8.5               | 0.528  |
| 0.72              | 9.3               | 0.500  |
| 0.70              | 10.3              | 0.470  |
| 0.68              | 11.4              | 0.438  |
| 0.66              | 12.8              | 0.404  |
| 0.64              | 14.5              | 0.368  |
| 0.62              | 16.6              | 0.330  |
| 0.60              | 19.2              | 0.282  |

† Nucleic acid is expressed as a percentage of the total (protein + nucleic acid).

**ESTIMACION DE PROTEINA POR EXTINCION A 260 Y 280 nm.**  
**Método de Warburg y Christian, B.Z. 310, 384 (1941).**

Medida de la extinción, de una solución diluida de proteína, a 260 y 280 nm; se calcula el cociente  $A_{280}/A_{260}$ . Usando este cociente se encuentra la concentración de proteína por medio del factor leído en la tabla y la absorbancia a 280 nm. Así la concentración está dada por:

$$\text{Concentración de proteína (mg/ml)} = A \quad \times \text{factor} \quad \times \quad 1/d.$$

Donde d = longitud de la celda en cm.

Los valores de la tabla fueron calculados a partir de enzimas de levadura ( $A_{260} = 1.18$ ,  $A_{280} = 2.06$  con una conc. de  $1\text{mg/ml}$ ). El método está sujeto a error en cuanto que sean otras proteínas y que los ácidos nucleicos presenten distintas extinciones.