

**" CARACTERIZACION DE LAS PROTEINAS RIBOSOMALES
ACIDAS DE EJES EMBRIONARIOS DE MAIZ "**

Tesis de Maestría en Ciencias Químicas (Bioquímica)

División de Estudios de Posgrado

Departamento de Bioquímica

Facultad de Química, U.N.A.M.

Q.F.B. María Elisa Briones Rosales

1993.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

Contenido

Abreviaturas

Resumen

I. Introducción

1. Aspectos generales sobre el maíz
2. Germinación
3. Síntesis de proteínas
4. Estructura y función del ribosoma
5. Proteínas ácidas del ribosoma.

II. Antecedentes experimentales

III. Definición del problema

IV. Metas

V. Materiales

1. Reactivos
2. Material biológico

VI. Técnicas

1. Obtención y condiciones de incubación de los ejes embrionarios de maíz.
2. Marcaje *in vivo* de proteínas ribosomales de ejes embrionarios
3. Obtención de ribosomas
4. Extracción de proteínas ribosomales totales.
5. Extracción de proteínas ácidas del ribosoma.
6. Cromatografía en CM-celulosa
7. Determinación de fosfoaminoácidos
8. Geles de poliacrilamida
9. Dot blot
10. Western blot

VII. Resultados

1. Extracción y purificación de ribosomas de ejes embrionarios de maíz.
2. Patrones electroforéticos y de fosforilación de proteínas ribosomales de ejes embrionarios de maíz.
3. Purificación de las proteínas ribosomales ácidas de ejes embrionarios de maíz.
4. Determinación de los residuos de aminoácidos fosforilados *in vivo* de las proteínas ribosomales ácidas de ejes embrionarios de maíz.

5. Determinación del pI de las proteínas ribosomales ácidas.

6. Localización de las proteínas ribosomales ácidas durante la germinación.

7. Efecto de la D-manosa sobre la fosforilación de las proteínas ribosomales ácidas.

VIII. Discusión

IX. Conclusiones

X. Literatura citada

Abreviaturas

ARN_m Acido ribonucleico mensajero

ARN_r Acido ribonucleico ribosomal

ARN_t Acido ribonucleico de transferencia

ATP Adenosín trifosfato

CM-celulosa Carboximetil celulosa

CK II Proteína Caseín cinasa tipo II

D.O. Densidad óptica

EDTA Ac. etilendiamintetraacético

EF-1 $\beta\gamma$ (eucariote) Factor de elongación que une GTP y el aminoacil ARN_t al sitio A del ribosoma.

EF-1 α (eucariote) Factor de elongación que recicla EF-1 $\beta\gamma$ y media la reacción de intercambio de EF-1 $\beta\gamma$ y GTP.

EF-G (procariote) y EF-2 (eucariote) Factor de elongación involucrado en el paso de traslocación.

GDP Guanosín difosfato

GTP Guanosín trifosfato

GTPasa Enzima que hidroliza GTP

HPLC Siglas en inglés de High Pressure Liquid Chromatography (Cromatografía líquida de alta presión).

IF-1 Factor de iniciación 1 en la síntesis de proteínas

IF-2 Factor de iniciación 2 en la síntesis de proteínas

IF-3 Factor de iniciación 3 en la síntesis de proteínas

nm nanómetro

Pi Grupo fosfato inorgánico

PMSF Fluoruro de fenil-metilsulfonilo

RF1 y RF2 Factores de liberación 1 y 2 durante el paso de terminación en la síntesis de proteínas.

SDS Dodecil sulfato de sodio

Sitio A Sitio de unión del aminoacil-ARN_t en el ribosoma

Sitio P Sitio de formación de enlace peptídico en el ribosoma

Sitio E Sitio de salida de la proteína recién sintetizada en el ribosoma.

TEMED N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina

30S(procariote) y 40S (eucariote) Subunidad pequeña del ribosoma

50S(procariote) y 60S (eucariote) Subunidad grande del ribosoma

RESUMEN

CARACTERIZACION DE LAS PROTEINAS ACIDAS DEL RIBOSOMA DE EJES EMBRIONARIOS DE MAIZ.

La fosforilación de las proteínas es un mecanismo de regulación de varias rutas metabólicas utilizado ampliamente por las células, entre las que se encuentra el proceso de síntesis de proteínas. Algunas de las moléculas involucradas en el proceso de síntesis de proteínas que se encuentran fosforiladas son los factores de iniciación, de elongación, de terminación, algunos aminoacil-tRNA sintetasas y algunas proteínas ribosomales.

Particularmente, durante la germinación de ejes embrionarios de maíz se encontraron diferentes patrones de fosforilación de proteínas ribosomales. Las proteínas de Mr de 15 y 16 kD son las proteínas ribosomales que presentan diferencias cuantitativas más evidentes a lo largo de la germinación. En este estudio se determinó la identidad de estas proteínas, caracterizándolas como proteínas ribosomales ácidas, además se definieron como fosfoproteínas utilizando pulsos de ortofosfato marcado y el análisis de las proteínas ribosomales a través de geles de poliacrilamida y autorradiografías. Estas proteínas fueron aisladas por medio de un método específico de extracción y cromatografía en carboximetil celulosa. El residuo de serina fue definido como el residuo de aminoácido fosforilado preferentemente. Se determinó un pI de 4.7 a 4.9, en estas proteínas por medio de enfoqueisoeléctrico en geles de poliacrilamida con un rango de anfólicas 2.5 a 5. La localización de las proteínas ácidas en ejes secos y germinados fue definida y se discute el probable papel regulatorio de estas proteínas durante la germinación.

Introducción

I. ASPECTOS GENERALES SOBRE EL MAIZ

Cerca del 70% del total de los alimentos consumidos por el hombre provienen directamente de las semillas y una gran proporción de la alimentación restante es derivada de los animales que también se alimentan de ellas. Debido a su importancia económica y a lo interesante de su biología hoy en día existen un gran número de investigaciones encaminadas al estudio de los eventos involucrados en el desarrollo de la semilla desde su formación hasta el establecimiento de la plántula. Una de las gramíneas de mayor consumo y estudio en el mundo es el maíz.

El maíz es una planta monoica, de cultivo anual y con un período vegetativo muy corto. Después de la fecundación, cada ovario se transforma en un fruto (cariópside), que lleva en su interior una sola semilla, la cual contiene sustancias de reserva en su endospermo y en la parte basal al embrión. La estructura de la semilla de maíz está conformada por: la testa, el endospermo y el eje embrionario (Esau, 1977).

El embrión esta formado por el escutelo y por el eje embrionario, el primero es la conexión entre el endospermo y el eje embrionario, además de ser el encargado de absorber los productos de hidrólisis de las reservas y transportarlos hacia el eje embrionario en crecimiento.

Por su parte el eje embrionario consiste en el hipocotilo que da origen a la hoja embrionaria con su cubierta llamada coleóptilo, la radícula y la coleorriza. Las células del eje embrionario contienen reservas de carbohidratos, proteínas, triacilglicéridos y ácidos nucleicos. Poseen protoplastidios, núcleo y mitocondrias (Mayer, 1989).

Las células con las estructuras antes descritas, activan su metabolismo al hidratarse la semilla a una temperatura adecuada. La semilla al encontrarse en un medio con elevada humedad, inicia la captación de agua, fenómeno conocido como imbibición, y que constituye el paso inicial y esencial hacia la germinación (Bewley y Black, 1985).

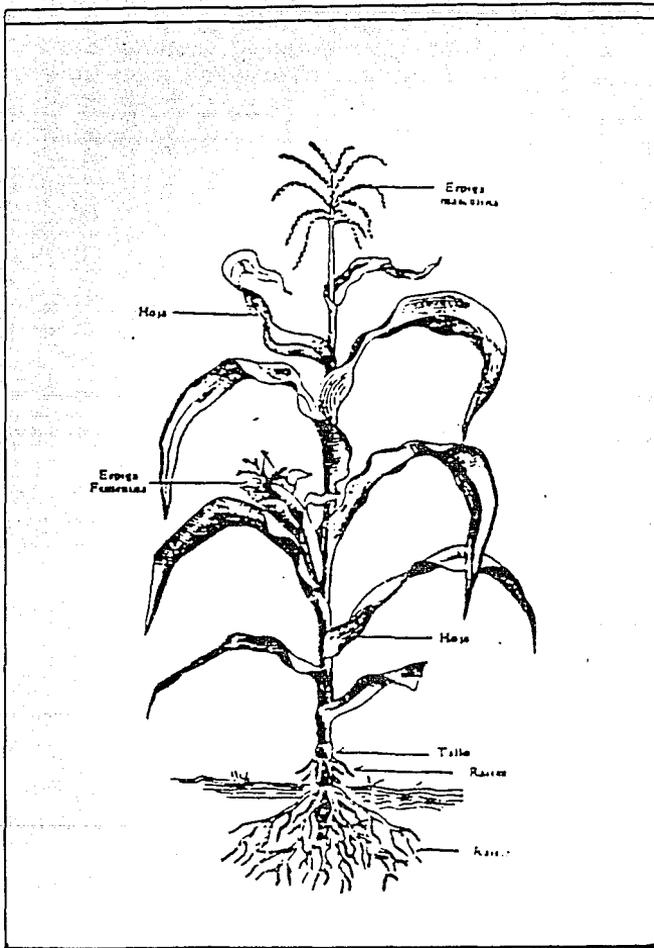


Figura 1. Representación de una planta de maíz. Planta de maíz madura mostrando sus diferentes órganos.

II. GERMINACION

Aún hoy en día no se tiene una definición genérica de la germinación ya que no han sido precisados todos y cada uno de los eventos bioquímicos y fisiológicos involucrados en el proceso.

Por ello, las definiciones varían de acuerdo al área de estudio de la germinación y al tipo de semilla de que se trate.

Así algunos fisiólogos definen a la germinación como un proceso que incluye la hidratación de la semilla, el restablecimiento de la actividad metabólica, la elongación de la radícula y su emergencia a través de la cubierta incluyendo el subsecuente crecimiento de la plántula (Salisbury y Ross, 1978)..

Medina define la germinación como el comienzo del crecimiento activo del embrión o sea su paso de la vida quiescente a la vida activa, siendo una de las fases críticas de la instalación de las plantas en condiciones naturales (Medina,1977). Bewley y Black definen la germinación desde la imbibición hasta la emergencia de la radícula o bien hasta el inicio de su elongación (Bewley and Black,1985).

Aun cuando no se haya precisado el período en el cual ocurre el proceso de germinación podemos decir que la germinación es el producto de un conjunto de procesos fisiológicos y bioquímicos como la respiración, la actividad enzimática y organelar, la síntesis de proteínas y de ARN que son iniciados a pocos minutos del comienzo de la imbibición, aun sin haberse hidratado completamente la semilla y que preparan al embrión para el crecimiento futuro (Mayer,1989).

Uno de estos procesos bioquímicos, es la síntesis de proteínas, y se ha demostrado que la pérdida de esta función conlleva a la muerte de la semilla pues no logra emerger la nueva planta (Mayer, 1989).

Para que la germinación se complete es esencial la síntesis de proteínas (Bewley y Black, 1985).

La síntesis de proteínas es uno de los procesos biológicos que primero se activan cuando se inicia la imbibición esto en germen de trigo (Seal y cols., 1977).

Se conoce que en embriones secos de trigo no hay polisomas formados incrementandose la cantidad de polisomas a los 20 minutos (Bewley y Black, 1985). Este fenómeno también ha sido observado en ejes quiescentes de maíz (Sánchez de Jimenez, 1984).

En varias especies de cereales, se han obtenido de los embriones secos varios de los componentes de la maquinaria de síntesis de proteínas (Bewley y Black, 1985).

Por otra parte, aun no es claro si entre los mensajes que se localizan en el embrión seco existan algunos que sean indispensables para la germinación (Dure III y Harris, 1977) o si los mensajes que se traducen al inicio son mensajes que se encuentran en el embrión seco o bien son mensajes idénticos que se sintetizan en los primeros minutos de la germinación.

Se ha detectado síntesis de ARN ribosomal a partir de la segunda hora de imbibición y este es incorporado a ribosomas, esto en germen de trigo (Huang y cols., 1980). También se ha localizado ARN de transferencia y aminoacil-tARN sintetasas en el eje seco.

Aparentemente la maquinaria completa de síntesis de proteínas esta lista para funcionar desde casi al inicio de la germinación.

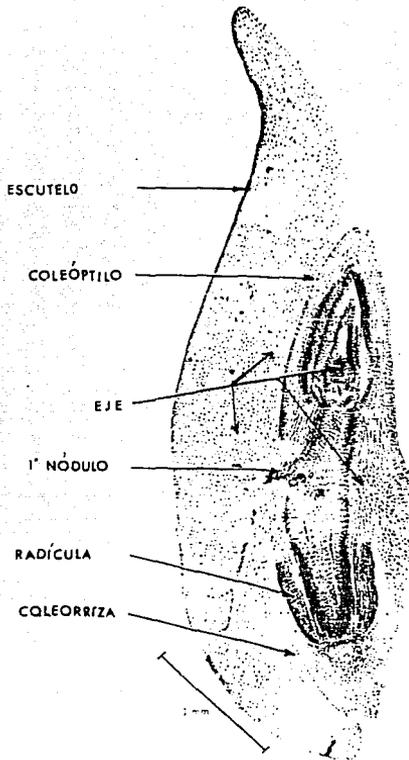


Figura 2. Embrión de maíz.. Corte longitudinal del embrión de maíz mostrando sus principales tejidos.

Esau, 1977.

III.SINTESIS DE PROTEINAS

La síntesis de proteínas es un proceso constituido por una serie de eventos esenciales para la vida tanto en células procariotes como en organismos superiores. Por ser de gran importancia, este proceso debe ser controlado molecular y metabólicamente en cada una de las etapas de la síntesis de polipéptidos..

En la síntesis de proteínas están involucrados los tres tipos principales de ARN. El ARN ribosomal (ARNr), el de transferencia (ARNt) y el mensajero (ARNm). El ARNm contiene la información genética para la síntesis de una proteína, el ARNm funcional en eucariotes, se forma por el empalme de los exones correspondientes presentes en la molécula de preARNm. En células eucariotes el extremo 5' del ARN mensajero esta modificado con una molécula de 7-metil-guanosina (5') ppp (5') Np y el extremo 3' por una secuencia de adeninas (cola de poliA). Hay tres ARNr en procariotes: 5S,16S y 23S y cuatro en eucariotes 5S, 5.8S, 18S y 26S y se encuentran formando parte constitutiva del ribosoma junto con las proteínas ribosomales. El ARNt es la molécula adaptadora en la traducción del mensaje y contiene al anticodón, triplete que debe reconocer el codón correspondiente en el ARNm.

A continuación se describen las fases generales en las que se divide la síntesis de proteínas: iniciación, elongación y terminación y las características peculiares de la traducción en células eucariotes.

Iniciación. La tarea esencial llevada a cabo por el proceso de iniciación es la orientación del aminoacil-ARNt en forma tal que el código de tripletes del ARNm sea leído en el marco apropiado. La lectura selectiva del codón de iniciación es dirigida por la información en el ARNm y la subunidad ribosomal 40S, actuando junto con tres factores de iniciación, eIF1, eIF2 y eIF3, y el nucleótido trifosfatado, GTP.El complejo de iniciación de la traducción se forma gradualmente.

Primero, los ribosomas 40S junto con eIF3 forman un complejo binario con una región del ARNm en una posición en el lado 5' del codón iniciador. Una vez que se ha establecido el complejo binario inicial, el mismo acepta el metionil-ARNt. Esta unión es dirigida por eIF2 junto con GTP. El complejo eIF2-GTP se une con el complejo ARNm-40S. Este proceso es ayudado por eIF1 y se acompaña de la liberación de eIF3. La formación del complejo de iniciación se completa con el agregado de la subpartícula 60S. Esto se acompaña de la hidrólisis de GTP a GDP y Pi y la liberación de eIF2 y eIF1.

Elongación. Una vez que se ha formado el complejo de iniciación, el crecimiento de la cadena polipeptídica ocurre por el agregado repetitivo de aminoácidos. Cada paso en este proceso de elongación requiere 1) la unión dirigida por codones de aminoacil-ARNt en un sitio de unión que en el primer paso es adyacente al sitio ocupado por met-ARNt, pero que en cada sitio sucesivo es ocupado por peptidil-ARNt, 2) la formación de uniones peptídicas que resulta de una peptidil-transferasa desde el metionil-ARNt o peptidil-ARNt al aminoácido del aminoacil-ARNt recientemente unido y 3) la translocación del ARNm y el peptidil-ARNt recientemente sintetizado al sitio ocupado por el ARNt eliminado. Este paso final da como resultado la expulsión del ARNt eliminado y la orientación del ribosoma de forma tal que el siguiente codón del ARNm es capaz de dirigir la unión del aminoacil-ARNt pertinente.

Este proceso de elongación identifica dos sitios de unión de ARNt en el ribosoma: el sitio a partir del cual el peptidil-ARNt transfiere el grupo carboxilo esterificado se conoce como sitio peptidilo o P y el sitio en el cual se une el aminoacil-ARNt entrante se denomina aceptor o A. Por lo menos tres factores protéicos y GTP, así como la actividad de peptidil transferasa están involucrados en la elongación de la cadena polipeptídica. Los tres factores de elongación son EF-1 α , EF-1 β y EF-2.

Estudios *in vitro* han demostrado que el EF-1 α , reacciona con GTP y aminoacil-ARNt para formar un complejo EF-1 α -aminoacil-ARNt-

GTP que a su vez reacciona con el complejo de iniciación o un complejo que está sufriendo la elongación de la cadena. En este punto, el aminoacil-ARNt se une al sitio aceptor en el complejo ARNm-ribosoma, dando como resultado la liberación de EF-1 α -GDP y Pi. El agregado del aminoacil-ARNt en el sitio aceptor es seguido inmediatamente por la formación de uniones peptídicas entre el grupo carboxilo esterificado de la metionina o la cadena peptídica en crecimiento del ARNt en el sitio donador y el grupo amino del aminoácido unido por el ARNt en el sitio aceptor; la formación de uniones peptídicas en este estadio no requiere gasto de energía. Luego de la formación de las uniones peptídicas y antes del agregado del siguiente aminoacil-ARNt al complejo de síntesis de proteínas, el sitio aceptor de aminoacil-ARNt debe vaciarse y orientarse apropiadamente en relación al siguiente codón en el ARNm. Estos procesos son llevados a cabo por una traslocación simultánea del ARNm y del peptidil-ARNt por un proceso que requiere EF-2 y GTP. El factor EF-2 posee una potente actividad de GTPasa que se manifiesta sólo en presencia de ribosomas.

El mecanismo de traducción da como resultado la reconstrucción del complejo ribosoma-ARNm, con expulsión de ARNt del sitio P. El GDP se disocia del complejo, el que es capaz de participar en el siguiente paso de la elongación.

Terminación. El proceso de elongación da como resultado una constante asociación de aminoácidos a la cadena polipeptídica en crecimiento. Este proceso exige un mecanismo para la terminación que da como resultado la detención del crecimiento de la cadena polipeptídica así como la liberación del ARNt desde el extremo carboxilo de la cadena peptídica. Se sabe que la terminación es causada por la información codificada en el ARNm y por factores de liberación de proteínas. Dos factores de liberación (RF1 y RF2) actúan en conjunto con los codones sin sentido para llevar a cabo la liberación de la cadena polipeptídica. Un factor adicional, RF3, actúa junto con RF1 y RF2 para facilitar esta liberación (Hershey, 1991 y Hill y cols., 1990).

Así, las investigaciones dedicadas al estudio de la síntesis de proteínas y su control han tratado de responder cómo está regulado este proceso, abordándose esta pregunta de varias maneras. Una de ellas es buscar el papel que tiene la fosforilación de las moléculas involucradas en la síntesis de proteínas, ya que hay un gran número de componentes del aparato de traducción que sufren eventos de fosforilación y desfosforilación. Se ha reportado que algunos factores de iniciación, factores de elongación, algunas proteínas ribosomales, etc.... son fosforilados en diversas células animales (Traugh, 1986).

Enfatizando la importancia de la fosforilación, encontramos que un gran número de moléculas protéicas que sufren esta modificación están involucradas en el proceso de síntesis de proteínas.

Entre las que se encuentra el eIF-2, particularmente se ha observado que existe correlación de la fosforilación de la subunidad α de eIF-2 y la represión en la síntesis de proteínas (Hershey, 1989).

Otros componentes de la maquinaria traduccional implicados en la unión de met-tARN al ribosoma como la subunidad β del eIF-2B, el eIF-2B y el eIF-3 son fosfoproteínas. La fosforilación de eIF-2B contribuye en el control del reciclaje de eIF-2B (Dholakia, 1988).

La selección y unión del mensaje es promovida al menos por tres factores: eIF-4A, una ATPasa dependiente de ARN involucrada en el desenrollamiento de la estructura secundaria del ARNm. El eIF-4B, que corresponde a una proteína de unión al ARNm y donde altos niveles de fosforilación de este factor se han relacionado con activación en la síntesis de proteínas y el eIF-4F, la cual reconoce el extremo 5' del ARNm. La fosforilación de eIF-4F, puede ser una excelente forma de controlar la velocidad global de síntesis de proteínas o inhibir o estimular la síntesis de proteínas específicas. La regulación de la unión y el sondeo puede influenciar las velocidad global de síntesis de proteínas. La fosforilación de ambos, los ribosomas y los factores de iniciación están implicados. Los factores de elongación también se fosforilan aunque el efecto de esta modificación

aun no esta definida (Duncan y cols.,1987; Ray y cols., 1983 y Nairn y cols., 1982).

Las proteínas ribosomales que se ha reportado reciben esta modificación son la S6 y las llamadas proteínas ácidas (P0,P1 y P2). Los niveles de fosforilación de la proteína S6 han sido relacionados con un aumento en la síntesis de proteínas (Traugh,1986). Con respecto al papel de las proteínas ácidas se sabe que forman parte de una de las protuberancias de la subunidad grande y la fosforilación de estas parece ser necesaria para que se unan a la partícula ribosomal (Lewin,1990,Sánchez-Madrid,1979). Estas moléculas están involucradas en la síntesis de proteínas a nivel de la elongación, por ser las proteínas a las cuales se unen los factores relacionados con este paso (Vidales,1984).

Los polipéptidos ácidos del ribosoma han sido estudiados en organismos procariotes y eucariotes. Sin embargo, la gran mayoría de los trabajos tratan sobre el aislamiento y caracterización de los fosfopolipéptidos sin determinar cual es el papel o la asociación de estas proteína con eventos más generales como crecimiento, diferenciación celular, etc...

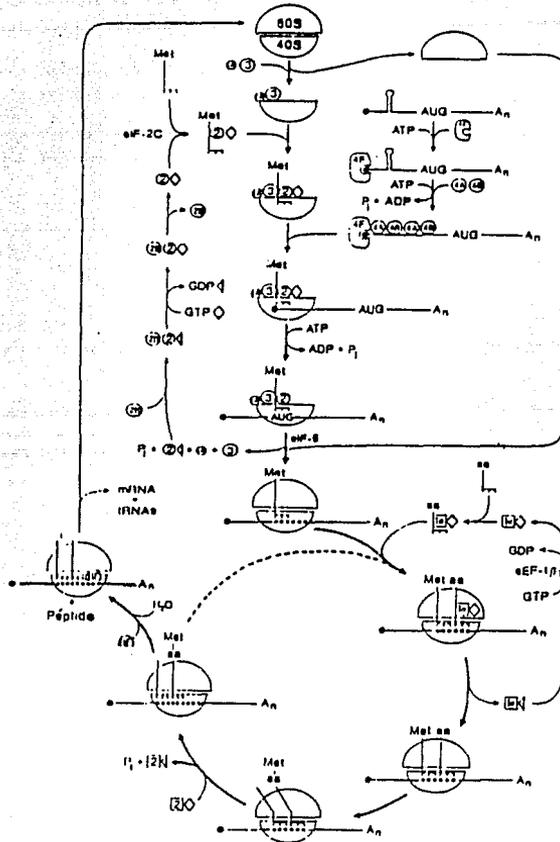


Figura 3. Ciclo del ribosoma. La figura muestra el modelo propuesto por Hershey para la síntesis de proteínas en células de mamíferos (eucariotes).

Hershey, 1991.

IV. ESTRUCTURA Y FUNCION DEL RIBOSOMA

El ribosoma es el principal componente involucrado en la síntesis de proteínas y el sitio físico donde se reúnen las proteínas para la realización de este proceso. El ribosoma representa una colección de varias enzimas, cada una activa solamente en el contexto de una estructura apropiada, cuyas actividades coordinadas dan como resultado la traducción eficiente del ARNm.

Los ribosomas son organelos presentes en bacterias, animales y plantas. En organismos eucariotes, los ribosomas están asociados al citoesqueleto o a membranas del retículo endoplásmico (Lewin, 1990). Todos los ribosomas pueden ser disociados en dos subunidades (la subunidad pequeña y la grande), cuando son tratados con bajas concentraciones de magnesio. Cada una de las subunidades se encuentra formada por ARN ribosomal y proteínas (a las cuales se les conoce genéricamente como proteínas ribosomales). La relación de estos componentes varía dependiendo de si el ribosoma es eucariote o procariote (Möller y Maassen, 1986). La interacción del ARN ribosomal y/o de las proteínas ribosomales puede variar si el ribosoma está o no participando en la síntesis de proteínas. Esto sugiere que cambios estructurales del ARNr o en las proteínas pueden ocurrir cuando se asocian las subunidades, cuando el ARN de transferencia está interaccionando o bien cuando las proteínas presentan modificaciones postraduccionales (Traut, et al., 1986, Lewin 1990). Los sitios reactivos del ribosoma comprenden cerca de las dos terceras partes de la estructura del ribosoma y son conocidos como el dominio traduccional, en el cual están involucradas las proteínas ácidas, y el segundo de ellos, como el dominio de salida (Lewin, 1990, Traut, 1986). Varios centros activos del ribosoma han sido utilizados para analizar la relación entre estructura y función y del estudio de estos se deduce

que el ribosoma parece ser una estructura con una relación muy estrecha entre sus componentes, en el cual un cambio en uno de estos centros puede afectar drásticamente la actividad de los otros (Figuras 4-8).

V.PROTEINAS ACIDAS DEL RIBOSOMA.

A.Características generales de las proteínas ácidas del ribosoma.

El ribosoma, la fábrica de proteínas de la célula, sincroniza las funciones de los factores de iniciación, elongación, factores accesorios, etc...para la síntesis correcta de una proteína. Desde hace más de 20 años se estudia a uno de los componentes del ribosoma; las proteínas ribosomales. La gran mayoría de las proteínas ribosomales tanto de ribosomas procariotes como de eucariotes tienen un pK básico ($pK > 9$) y se presentan en una copia, con excepción de las llamadas proteínas ácidas del ribosoma, las cuales presentan valores de pK entre 4.8 y 4.9, están localizadas en la subunidad grande del ribosoma y pueden presentar más de una copia por ribosoma.

A las proteínas ácidas del ribosoma se les ha denominado de diferente manera dependiendo del organismo en estudio (Tabla I), Así las de *E.coli* forman un complejo pentamérico constituido por dos dímeros de proteínas ácidas llamadas L7 y L12, más una copia de la proteína L10. Este complejo se une al rRNA 23S para constituir una de las protuberancias de la subunidad grande del ribosoma, que es parte del dominio de traducción incluyendo la cabeza y la plataforma de la subunidad pequeña y a L1 (Möller y Maassen, 1986). La diferencia entre las proteínas L7 y L12 en *E.coli* es que L7 presenta acetilada la serina de su extremo amino terminal y la proteína L12 no (Mac Connell, 1982).

En mamíferos las proteínas semejantes a L7 y L12 se han denominado proteínas A por presentar las siguientes características: Un pK ácido y estar compuestas de residuos de aminoácidos poco usuales, gran

cantidad de alanina, pocos residuos de aminoácidos aromáticos y pocos o ningún residuo de arginina, cisteína y triptófano. A estas proteínas de mamífero también se les ha denominado proteínas "P" por encontrarse fosforiladas (Wool,1991).

Tabla I.

Proteínas ribosomales ácidas. Nomenclatura y pesos moleculares asignados a las proteínas ácidas del ribosoma dependiendo del organismo de origen.

<i>E.coli</i>	<i>S.cervisiae</i>		Mamífero	
	Nombre	P.M.	Nombre	P.M.
L7	L44'YP1 β	10,947	P1	11,490
L12	L4 YP2. α 12,000		P2	11,684
L10	L44 YP2 α		P0	34,178

(Lin,1982;Amons,1982;Mitsui,1988;Prieto,1991 y Wool,1991).

También han sido secuenciadas las proteínas ribosomales ácidas de humano, rata, levadura y *Dictyostelium discoideum* y los resultados muestran que la secuencia de sus aminoácidos es muy semejante (Lin,1982;Amons,1982;Mitsui,1988;Prieto,1991 y Wool,1991). Es interesante hacer notar el hecho de que los últimos 10 aminoácidos del extremo carboxilo terminal están totalmente conservados en todos los organismos eucariotes estudiados, sugiriendo su importancia funcional en estas proteínas. Llama la atención que la secuencia carboxilo terminal contiene el epítipo que es reconocido por anticuerpos formados en algunos pacientes con lupus eritematoso sistémico (Nojima,1989).

	Ribosoma	Subunidad pequeña	Subunidad grande
Velocidad de sediment. Peso molecular (dáltones)	70S 2 520 000	30S 930 000	50S 1 590 000
RNA mayores RNA menores Peso molecular del RNA Proporción de RNA	1 664 000 56%	16S = 1541 bases + 23S = 2904 bases 560 000 60%	23S = 2904 bases 5S = 120 bases 1 104 000 70%
Número de proteínas Peso molecular total de las proteínas Proporción de proteína	857 000 34%	21 polipeptidos 370 000 40%	34 polipeptidos 487 000 30%

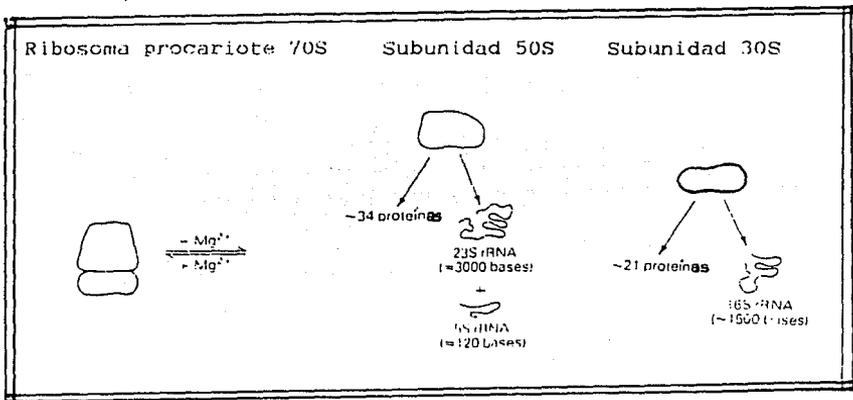


Figura 4. Características generales del ribosoma procaríote. La figura muestra los principales componentes de las subunidades del ribosoma como son el ARN ribosomal y las proteínas ribosomales.

Lewin, 1990.

	Ribosoma	Subunidad pequeña	Subunidad grande
Velocidad de sediment. Peso molecular (daltones)	80S 4220000	40S 1400000	60S 2820000
RNA mayores RNA menores		18S = 1874 bases	28S = 4718 bases 5.8S = 162 bases 5S = 120 bases
Peso molecular del RNA Proporcion de RNA	2520000 60%	700000 50%	1820000 65%
Numero de proteínas Peso molecular total de las proteínas Proporcion de proteínas	700000 40%	33 polipeptidos 700000 50%	49 polipeptidos 1000000 35%

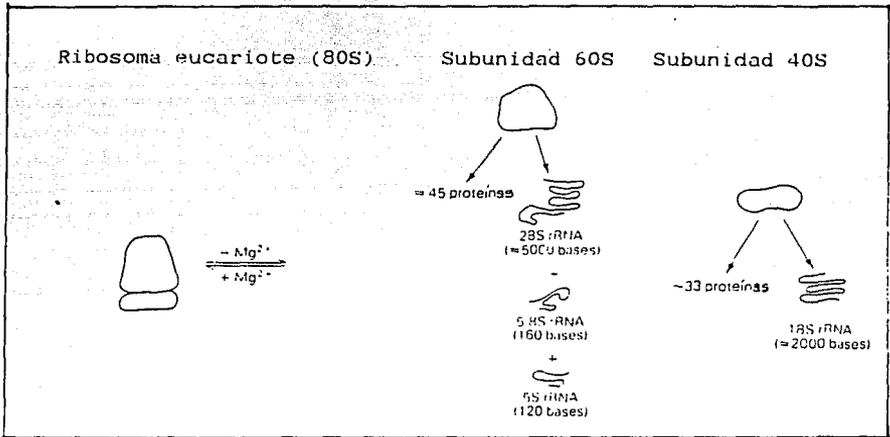


Figura 5. Características generales del ribosoma eucariote. La figura muestra los principales componentes de las subunidades del ribosoma como son el ARN ribosomal y las proteínas ribosomales.

Lewin, 1990.

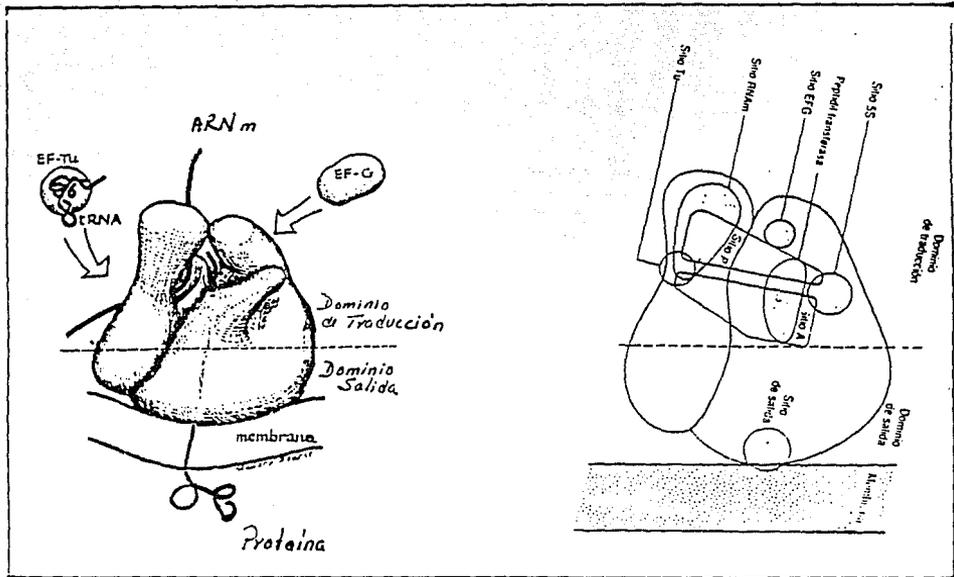


Figura 7. Dos esquemas que muestran a los dos grandes dominios del ribosoma. Ribosoma procarionte en donde se ven representados el dominio de salida y el de traducción, dentro de este último se encuentran localizadas las proteínas ácidas del ribosoma y su orientación con respecto al sitio de unión de la membrana.

Lewin, 1990 y Möller y Maassen, 1986..

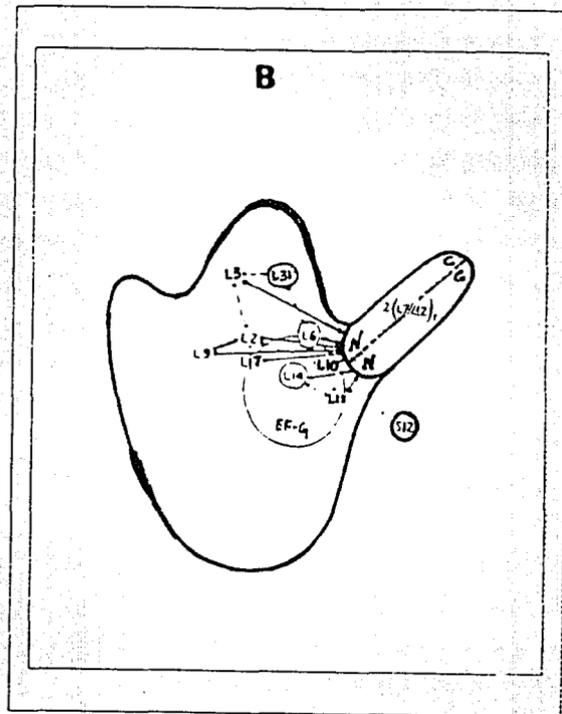
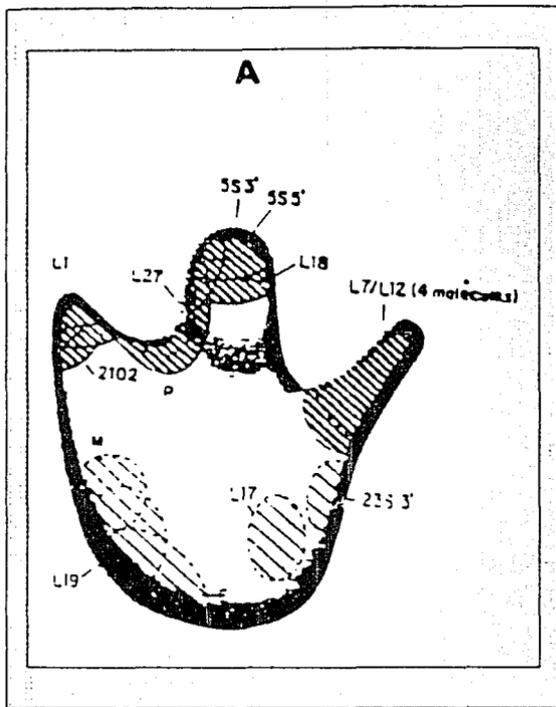


Figura 8. Se observan dos representaciones de la subunidad grande del ribosoma. En A aparecen las posiciones de las proteínas ribosomales y el número de copias de cada una de ellas. Véase en la protuberancia derecha la posición de las proteínas ácidas del ribosoma. También se encuentran marcados los diferentes sitios activos P, M y E. En B se muestra la interrelación entre las proteínas de la subunidad grande y la orientación del extremo amino y carboxilo terminal de las proteínas ribosomales ácidas.

B. Estructura de las proteínas ácidas del ribosoma

Utilizando programas de predicción de estructura y refracción de rayos X se propone que el dímero L7/L12 presenta las siguientes características:

1. Dos cadenas alfa-hélices enrolladas entre sí
2. Los dominios carboxilo terminal presentan una estructura globular
3. El dominio amino terminal comprende del aminoácido 1 al 50 y está formado por una cadena alfa hélice con su extremo libre.
4. Las dimensiones del dímero son: 135 A X 10 A lo cual le da forma de un cilindro.

Los dos dímeros forman un ángulo en la parte del extremo amino terminal que se une a la proteína ribosomal L10 (Möller y Maassen, 1986).

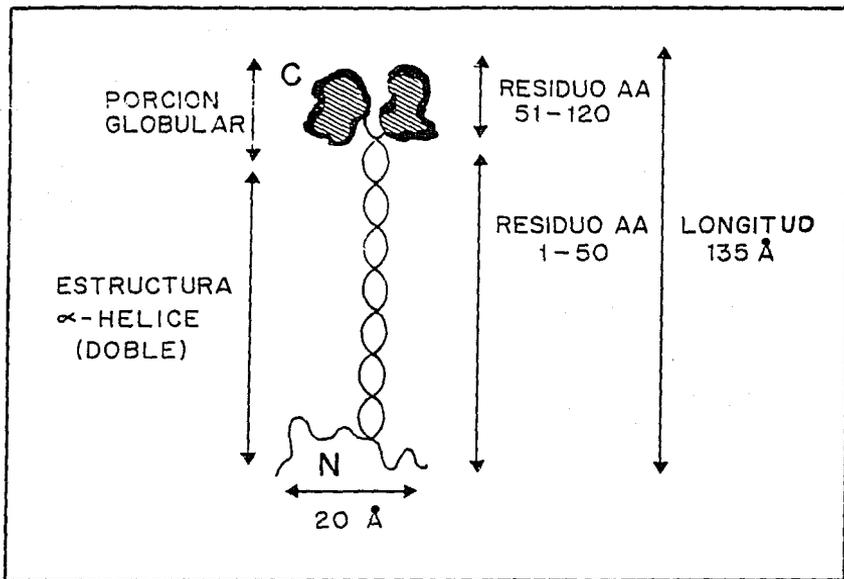


Figura 9. Representación esquemática de la estructura del dímero formado por las proteínas ribosomales ácidas. Longitud 135 Å, consta de 120 residuos de aminoácidos. Del residuo 1 al 50 corresponde al extremo amino terminal y del residuo 51 al 120 al dominio carboxilo.

C.Función de las proteínas ácidas del ribosoma

Las proteínas ribosomales ácidas de bacterias y animales están relacionadas física, química e inmunológicamente y al parecer tienen funciones muy similares (Wool,1991).

El dominio formado por el dímero de L7 y L12 y la proteína L10 es el sitio de asociación para factores de iniciación y factores de elongación, que promueven la unión del aminoacil-tRNA, la translocación y la catálisis de la hidrólisis de GTP (Möller y Maassen, 1986).

Se han reportado semejanzas funcionales entre proteínas ácidas de ribosomas bacterianos y de células superiores, utilizando partículas carentes de estas proteínas obtenidas por lavados de los ribosomas con NH_4Cl y 50% de etanol, tratamiento que induce la liberación de las proteínas ácidas (Sánchez-Madrid,1979).

Las subunidades ribosomales 50S de *E.coli* carentes de L12 y L7 no tienen actividad de GTPasa, pero su GTPasa dependiente del factor de elongación (EF-G) es restablecida por la adición de estas proteínas(Moller y Maassen, 1986). Cuando se adicionan anticuerpos contra las proteínas L7 y L12 a la mezcla de reconstitución, las partículas resultantes carecen de actividad de GTPasa y a su vez éstos también previenen la formación de un complejo entre EF-G,GTP,la subunidad 50S y el ácido tusídico, inhibidor de la traslocación (Traut,et al .,1986).

Estos datos indican que las proteínas L7 y L12 están involucradas en la hidrólisis de GTP durante la traslocación, por actuar como sitio de unión para los factores de elongación en la subunidad 50S.

D. Fosforilación de las proteínas ácidas del ribosoma y su importancia.

Como se mencionó anteriormente, las proteínas ácidas del ribosoma de diferentes organismos parecen ser funcional y estructuralmente muy semejantes y tienen un papel importante en la interacción con los factores provenientes del citoplasma y los ribosomas. Otra característica de estas proteínas es que su concentración en el ribosoma no es constante y depende del estado metabólico de la célula (Sáenz-Robles, et al, 1990).

A diferencia de su contraparte procarionte, las proteínas ácidas de ribosomas eucariotes aparecen fosforiladas en el ribosoma y son intercambiables *in vivo*. La fosforilación parece ser necesaria para que las proteínas ácidas se integren a la subunidad grande durante el ensamblaje de los ribosomas (Sánchez-Madrid, 1979; Zinker, 1976).

Las proteínas ácidas en el ribosoma de levadura se encuentran monofosforiladas, detectándose un "pool" de proteínas ácidas ribosomales desfosforiladas en el citoplasma de la célula. La desfosforilación *in vitro* muestra un efecto negativo en la afinidad de las fosfoproteínas ácidas por los ribosomas. La fosforilación de las proteínas ribosomales ácidas de *S.cerevisiae* se lleva a cabo en residuos de serina (Maranda y Ballesta, 1991).

Se ha reemplazado cada uno de los ocho residuos de serina presentes en la secuencia de aminoácidos de las proteínas ribosomales ácidas de *S.cerevisiae* YP2 (L45) por diferentes aminoácidos por medio de mutagénesis heteroduplex de sitio dirigido y se observa que al sustituir

la serina de la posición 19 por alanina, aspártico o treonina se previene la fosforilación *in vivo* de la proteína y su interacción con el ribosoma. El resto de las mutaciones, en las diferentes serinas, no tienen efecto ni en la fosforilación ni en la capacidad de unión al ribosoma (Naranda y Ballesta, 1991).

La información anterior confirma la fosforilación de estos polipéptidos como un requisito para su actividad funcional *in vivo* y da fuerte evidencia de que la fosforilación de las proteínas ácidas juega un papel importante en la actividad de la partícula. Más aun, estos datos apoyan la existencia de un mecanismo de control de la síntesis de proteínas a través de la integración de las proteínas ácidas al ribosoma.

E. La proteína cinasa y la proteína fosfatasa específicas de la fosforilación y desfosforilación de las proteínas ribosomales ácidas.

La fosforilación de las proteínas ácidas del ribosoma está bien documentada. Sin embargo, las enzimas responsables de la fosforilación-desfosforilación de estos polipéptidos no se han identificado ni caracterizado aún. Los datos que se conocen acerca de estas proteínas son muy pocos y la localización de la proteína cinasa y de la proteína fosfatasa no se conoce con certeza.

Hay reportes de experimentos realizados con ribosomas de hígado de rata que indican que las proteínas ácidas pueden ser fosforiladas *in vitro* por una proteína cinasa endógena asociada al ribosoma (Reboud, et al., 1978 y Mac Connell y Kaplan, 1982).

El reporte más reciente que trata sobre la fosforilación *in vitro*, de las proteínas ribosomales ácidas se realizó con la adición exógena de una proteína cinasa del tipo caseína cinasa II (CK II) y ATP: Los patrones autorradiográficos muestran que la enzima unida al ribosoma presenta el mismo patrón que la CK II exógena y localizan además el sitio de

fosforilación en el extremo carboxilo terminal. También se sintetizó el péptido con la secuencia que se fosforila por la CK II y se observa que inhibe competitivamente a la cinasa endógena (Hasler y cols., 1991).

Esto hace pensar que la cinasa responsable de la fosforilación es una proteína cinasa del tipo de la CK II o bien la CK II. La localización de la CK II es generalmente citoplasmática.

Aunque aún no se tengan datos claros sobre la localización, las características cinéticas, los requerimientos de las proteínas cinasa y fosfatasa específicas de las proteínas ácidas del ribosoma, se les reconoce el papel que deben tener en la regulación de la actividad de los ribosomas.

Antecedentes Experimentales

El propósito de este apartado es dar a conocer los datos obtenidos en el laboratorio que sirvieron como antecedentes experimentales para la investigación presente. Los hallazgos más importantes relacionados con este tema son:

a) El control postranscripcional observado durante la germinación de embriones de maíz. Este fenómeno se observó en experimentos en los cuales se utilizó α -amanitina para prevenir la síntesis *de novo* ARNm. Los patrones de síntesis de proteínas *in vivo* de proteínas en ejes embrionarios de maíz entre las 6 h y las 24 h de imbibición de ejes embrionarios (Sánchez de Jiménez, 1981), mostraron cambios consistentes en la aparición de nuevas proteínas que se observan por medio del análisis electroforético en geles de dos dimensiones. Bajo las condiciones del ensayo no se presentó la síntesis de nuevos ARNm por lo que la aparición de nuevas proteínas se interpretó como la traducción de mensajeros almacenados en el embrión que, aunque presentes desde la etapa de 6 h, no se traducen sino hasta una etapa más avanzada de la germinación. La no expresión de algunos mensajes, ocurre posiblemente por un control traduccional, operante en esa etapa del desarrollo.

b) Otro tipo de control que ha sido determinado durante el proceso de germinación es la alteración en los patrones autorradiográficos en la fosforilación de las proteínas producida por aplicaciones de auxinas exógenas (Pérez, 1987) entre las que se han visto afectadas las proteínas ribosomales (Pérez, 1988). Usando este efecto en un sistema heterólogo de traducción *in vitro* (ribosomas provenientes de maíz y mensajeros exógenos) se comparó la selectividad de traducción de los ribosomas extraídos de ejes embrionarios tratados y no tratados con auxinas. En este sistema se tradujo un grupo de ARN mensajeros específicos heterólogos al sistema de maíz, como lo fueron los cuatro ARNs genómicos del virus del Bromo-Mosaico (BMV).

La evidencia obtenida apoya la existencia de un sistema de selección de los mensajes por los ribosomas o bien de un acoplamiento diferente de los mensajes con los ribosomas (Ibarra Caballero,1990), lo cual resulta en una velocidad de traducción diferencial para cada ARNm presente.

c) El antecedente más inmediato se tuvo estudiando la fosforilación de proteínas ribosomales durante la germinación de maíz. En este sistema se encontró que existe un control temporal en la fosforilación de algunas de las proteínas ribosomales: la 30.9 kD en la que la incorporación de ortofosfato radiactivo se inicia entre las 3 y 5 h y las proteínas de 15.8 y 14.8 kD cuya incorporación de ^{32}P decrece conforme la germinación avanza cesando casi por completo a las 30h. Aparentemente este evento está regulado por señales internas propias del desarrollo ya que no depende de la síntesis de proteínas, por lo que se concluyó que la(s) cinasa(s) responsable de este evento ya está(n) presente(s) en la semilla seca (Pérez-Méndez, 1991).

Definición del problema

Reconociendo la importancia de los eventos de fosforilación de los ribosomas en la regulación de la síntesis de proteínas a nivel molecular, se propone la siguiente hipótesis de trabajo. Durante la germinación de ejes embrionarios de maíz, las proteínas ribosomales que muestran los mayores cambios en el grado de fosforilación son las proteínas ácidas del ribosoma y la localización de dichas proteínas en las células de estos tejidos dependerá de las condiciones metabólicas de las semillas de maíz.

Reconociendo la importancia de los eventos de fosforilación de los ribosomas en la regulación de la síntesis de proteínas a nivel molecular, se propone la siguiente hipótesis de trabajo. Las proteínas ribosomales que muestran los cambios más significativos en el grado de fosforilación durante la germinación de ejes embrionarios de maíz son las proteínas ácidas del ribosoma y la localización de dichas proteínas en las células de estos tejidos dependerá de las condiciones metabólicas de las semillas de maíz.

Metas

1) Aislar y caracterizar electroforéticamente a las proteínas ácidas del ribosoma a lo largo de la germinación.

2) Se sabe por antecedentes en la literatura que proteínas ribosomales de hígado de rata (Wool, 1978), de células en cultivo de tomate (Scharf y Nover, 1982), etc. se fosforilan por lo que se procedió a determinar la característica de fosfoproteína de las proteínas ribosomales totales y específicamente de las proteínas ácidas de ribosomas de ejes embrionarios de maíz durante la germinación.

4) En el caso de encontrarse fosforiladas las proteínas ácidas del ribosoma: Determinar el tipo de residuo de aminoácido fosforilado *in vivo* en las proteínas ácidas del ribosoma.

3) Definir el pI de las proteínas ribosomales ácidas.

5) Estudiar si existe una poza de proteínas ácidas semejantes a las del ribosoma en el citoplasma y si estas proteínas son intercambiables con las proteínas del ribosoma durante la germinación.

1) Aislar y caracterizar electroforéticamente a las proteínas ácidas del ribosoma a lo largo de la germinación.

2) Definir el pI de las proteínas ribosomales ácidas.

3) Determinar si las proteínas ribosomales ácidas de ejes embrionarios de maíz se fosforilan durante la germinación.

4) Determinar el tipo de residuo de aminoácido fosforilado *in vivo* en las proteínas ácidas del ribosoma.

5) Estudiar si existe una poza de proteínas ácidas semejantes a las del ribosoma en el citoplasma y si estas proteínas son intercambiables con las proteínas del ribosoma durante la germinación.

Materials

1. REACTIVOS

Acidos

Acético glacial	Baker Analyzed
Clorhídrico	Baker Analyzed
Fosfórico	Baker Analyzed

Solventes

Acetona	Merck
Agua desionizada	
Agua oxigenada	Baker Analyzed
Etanol	Merck
Glicerol	Merck
Metanol	Merck

Amortiguadores

Tris-HCl	Sigma
Hepes	Sigma
Glicina	Aldrich

Colorantes

Azul de bromofenol	Sigma
Azul de Coomassie.G-250	Sigma
Azul de Coomassie R-250	Sigma

Detergentes

Nonident P-40	Sigma
Tritón X-100	Sigma
Tween	Sigma
SDS	Sigma

Electroforesis

Acrilamida	Sigma	
Anfolinas	Pharmacia	
β -mercaptoetanol	Merck	
Bis-acrilamida	Sigma	
Marcadores de peso molecular para gel con SDS		Sigma
Persulfato de amonio	Sigma	
TEMED	Sigma	
Urea	Sigma	
Enzimas		
Fosfatasa alcalina		Sigma
PMSF	Sigma	

Quelantes

EDTA	Merck
EGTA	Merck

Resina

CM-celulosa	Sigma
-------------	-------

Sales

Carbonato de sodio (Na_2CO_3)	Merck
Cloruro de amonio (NH_4Cl)	Merck
Cloruro de magnesio (Mg_2Cl)	Merck
Cloruro de potasio (KCl)	An Alit
Cloruro de sodio (NaCl)	Mallinckrodt
Fluoruro de sodio (NaF)	Sigma
Hipoclorito de calcio ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$)	Técnica Química S.A.
Hidróxido de sodio (NaOH)	Baker Analyzed Reactivo
Sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	Merck
Tartrato de sodio y potasio	Técnica Química S.A.

Varios

β -glicerofosfato	Sigma
4-cloro-1-naftol	Sigma
Leche descremada (Sveltes-Nestlé)	
Reactivo de Folin-Ciocalteu	Merck
Sacarosa	Sigma
Película para radiografía clínica Cronex-Dupont y Kodak	
Soluciones reveladora y fijadora de Kodak	
^{32}P ortofosfato de Dupont. New Nuclear England.	

2. MATERIAL BIOLÓGICO

Ejes embrionarios de semillas de maíz *Zea mays* L. de la variedad Chalqueño.

Técnicas

1) Obtención y condiciones de incubación de los ejes embrionarios de maíz

Los ejes embrionarios de maíz fueron manualmente separados del resto de la semilla, se enjuagaron con etanol al 70% durante 15 segundos, se esterilizaron con hipoclorito de sodio al 5% durante 5 minutos y se enjuagaron al menos cinco veces con agua destilada estéril y se eliminó el exceso de agua con papel absorbente estéril. Posteriormente los ejes fueron incubados en medio nutritivo sólido (Murashige-Skoog, 1962), pero sin auxinas, durante el periodo de tiempo necesario para cada uno de los experimentos a 25 °C, sin agitación. Después del periodo de incubación los ejes fueron enjuagados, secados y congelados a -70 °C.

2) Marcaje *in vivo* de proteínas ribosomales de ejes embrionarios

Doscientos mg de ejes embrionarios, que equivalen a 30 ejes sin germinar, fueron utilizados para el marcaje cuando se obtuvieron proteínas ribosomales totales y 1 g cuando se aislaron proteínas ribosomales ácidas. Los ejes embrionarios fueron tratados como se indicó anteriormente, pero una hora antes del tiempo requerido de incubación se les agregó 125 μCi de ortofosfato ^{32}P , diluido con agua estéril y desionizada en un volumen final de 200 μl . Después de la hora de pulso se enjuagaron con agua desionizada y estéril y se secaron con papel absorbente y se congelaron a -70 °C.

3) Obtención de ribosomas

Se siguió el método de Scharf y Nover, 1982 con algunas modificaciones.

Soluciones

Amortiguador A1: Tris.HCl 20 mM, MgCl_2 5 mM, KCl 20 mM, NaF 5 mM, β -mercaptoetanol 0.5%, Tritón X-100 1 %, Sacarosa 0.25 M, β -glicerofosfato 80 mM y PMSF 1 mM.

Colchón de sacarosa: Sacarosa 0.5 M y KCl 0.5 M en amortiguador A1.

En un mortero se pulverizaron 200 mg de ejes con N₂ líquido, se homogenizó con 5 ml de amortiguador A1. Este homogenizado se centrifugó en tubos de 25 ml de capacidad en un rotor JA-20 en una centrifuga Beckman modelo J21 a 15,000 rpm (27000 X g) durante 5 minutos a 4 °C; se descartó el sedimento y la capa superior que contenía los lípidos se volvió a centrifugar con las mismas condiciones sólo que ahora por 20 minutos.

El sobrenadante se centrifugó en tubos de policarbonato, con una capacidad de 8 ml, sobre 3 ml de un colchón de sacarosa, en un rotor de ángulo fijo 75 Ti en la ultracentrifuga Beckman a 50,000 rpm (269,000 x g) durante 4 h a 4 °C.

El sedimento correspondió a los ribosomas los cuales se resuspendieron en distintos amortiguadores dependiendo de si se extraerían proteínas ribosomales totales o las proteínas ácidas.

4) Extracción de proteínas ribosomales totales

Se siguió el método descrito por Ramjoué, 1977.

Los ribosomas fueron resuspendidos en amortiguador A2 (Hepes 20 mM, pH 7.6, KOH 20 mM, Mg(AcO)₂ 5 mM, KAcO 125 mM y 6 mM β-mercaptoetanol), posteriormente se adicionó a un volumen de ribosomas 0.1 volumen de MgCl₂ 1M y dos volúmenes de ácido acético glacial, la mezcla se agitó al menos durante 45 minutos. Todo el proceso se llevó a cabo a 0°C. El precipitado formado, que corresponde al ARNr, se separó centrifugando la muestra a 10,000 rpm por 2 minutos. El sobrenadante contenía las proteínas, mismas que se recuperaron después de ser precipitadas con tres volúmenes de acetona a -20 °C, durante toda la noche.

5) Extracción de proteínas ácidas del ribosoma

El método que a continuación se describe fue proporcionado amablemente por el Dr. Samuel Zinker del CINVESTAV.

Amortiguador I

Tris-HCl 100mM, pH 7.4, MgCl₂ 12 mM, KCl 80 mM, β-mercaptoetanol 5 mM.

Amortiguador SP 1.5.

Tris-HCl 10mM, pH 7.4, MgCl₂ 20 mM, NH₄Cl 1500 mM, β-mercaptoetanol 3 mM.

Etanol al 95%

La pastilla ribosomal obtenida se resuspendió en 500 μl del amortiguador I. Se tomó una alícuota de 2 μl de la muestra y se llevó a 400 μl con agua, se leyeron las absorbancias a 260 y 280 nm en el espectrofotómetro. Se ajustaron los ribosomas a 100 D.O. a 280 nm/ml con la solución SP 1.5, se agitaron durante 20 min. Se extrajeron las proteínas ácidas con la mitad del volumen de etanol y se agitó por 10 min, se agregó la otra mitad del volumen de etanol y se agitó por 5 min., se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min. Desde el inicio del procedimiento hasta este paso todo debe de trabajarse a 0 °C. Al sobrenadante se le añadieron 3 volúmenes de acetona y se dejó precipitando a -20 °C durante toda la noche. Se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min. La pastilla obtenida se secó evaporando el exceso de acetona.

6) Cromatografía en carboximetil celulosa

El precipitado conteniendo las proteínas ribosomales se resuspendió en acetato de amonio 1 M en 6M de urea, pH 6. Se colocó sobre la resina y se incubó durante 1 hora a 37 °C, se centrifugó y las proteínas del sobrenadante se precipitaron con acetona a -20 °C durante toda la noche.

6.1) Activación de la resina de CM-celulosa

La resina se resuspendió en NaOH 0.5 M, se lavó con agua desionizada hasta alcanzar un pH de 8, se ajustó el pH a 6 con HCl 0.1 N.

7) Determinación de fosfoaminoácidos.

Este método me fue gentilmente comunicado por la M. en C. Alicia Gamboa.

Las proteínas ácidas ribosomales purificadas de ejes embrionarios de maíz fueron resuspendidas en HCl 6N e hidrolizadas durante dos horas a 80 °C en una ampolleta sellada. Previamente se saturó la placa de sílica gel con una mezcla de ácido acético al 8% y EDTA 5 mM. Se aplicaron las muestras junto con estándares de fosfoserina, fosfotreonina y fosfotirosina, se corrió la electroforesis durante 3 horas a 400V.

8) Geles de poliacrilamida

Se siguió la metodología de Laemmli, E.K., 1970.

8.1) Geles desnaturalizantes en placa en una dimensión

Soluciones

Amortiguador de corrida
Tris HCl 0.25 mM, pH 6.8
Glicina 0.192 M
SDS 0.1%

Amortiguador de muestra
Tris HCl 62.5 mM, pH 6.8
SDS 2.3%
 β -mercaptoetanol 5%
Azul de bromofenol 0.01%
Urea 8M

Soluciones para geles de poliacrilamida

Solución 1: Acrilamida 29.2% y N,N'-metilen-bis-acrilamida 0.8%

Solución 2: Tris 1.5 M pH 8.8

Solución 3: Tris 1.0 M pH 6.8

Solución 4: SDS 10.0%

Solución 5: Persulfato de amonio al 10%

Solución 6: TEMED

Estándares de peso molecular

Albúmina bovina

66,000 Da

Albúmina de huevo	45,000 Da
Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa	36,000 Da
Anhidrasa carbónica	29,000 Da
Tripsinógeno	24,000 Da
Inhibidor de tripsina	20,100 Da
α -lactoalbúmina	14,000 Da

El gel separador tuvo una concentración de 15% y el gel apilador del 4%.

Los aparatos Hoefer Scientific fueron ensamblados con las placas de vidrio limpias y libres de detergentes, las soluciones se hicieron en los porcentajes antes mencionados, los geles separadores tuvieron una longitud de 11 cm. Los geles se corrieron a 30 mA por placa durante 6 horas o bien hasta que el frente llegó a 1 cm antes de finalizar el gel.

8.2) Isoelectroenfoque

El procedimiento es una modificación del método de O'Farrel, 1975.

Soluciones

Solución 1: Urea 9.5 M

Solución 2: Acrilamida 30% (28.3 % de acrilamida y 1.62% de bis-acrilamida)

Solución 3: NP 40 al 10% en agua

Solución 4: Anfolinas. Rango de pH 2.5 a 5

Solución 5: Persulfato de amonio al 10% en agua

Solución 6: TEMED

Solución 7: Urea 6 M

Solución A: Gel de acrilamida

Solución 1	5.75 g
Solución 2	1.33 ml
Solución 3	2 ml
Agua d y d	2 ml
Solución 4	200 ml
Solución 5	100 ml
Solución 6	10 ml
Volumen final	25 ml

Solución B: Amortiguador de muestra

Solución 1	5.5 g
Solución 2	0.2 ml
Solución 4	0.2 ml
β -mercaptoetanol	0.5 ml
Agua d y d	para 10 ml

Solución C: Solución sobregel

Solución 7	5.5 g
Solución 4	0.1 ml
Agua	para 10 ml

Solución D: NaOH 20 mM en agua

Solución E: H_3PO_4 100 mM en agua

Procedimiento

Se ensambló el equipo para electroforesis (Hofer Instrument), se preparó la solución A y se desgasificó durante 10 minutos, se llenó la placa y se colocó el peine, después de gelificarse se enjuagaron los pozos y se eliminó el agua con papel absorbente, se colocaron 10 μ l de la solución B y encima de esta 10 μ l de la solución C, se llenaron los pozos con solución D. Se montó el equipo de electroforesis, el recipiente inferior se llena con la solución E y el superior con la D. se precorrieron a: 200 V 30 min, 300 V 30 min y a 400 V 1h.

Al finalizar la precorrida, se eliminó la solución D, así como las soluciones que estaban encima de los pozos, se enjuagó con 20 μ l de agua, el agua se secó con papel absorbente. La muestra se aplicó, después se colocaron 10 μ l de la solución B y 10 μ l de la C. Se dejó correr a 400 V por 5h. Posteriormente se tiñó con azul de Coomassie y se destiñó.

8.3) Geles de poliacrilamida en tubo.

Soluciones

Se utilizaron las mismas soluciones que en los geles de isoelectroenfoque además de:

Solución F

Para conservar geles

Tris HCl pH 6.8 60mM, SDS 2%, β -mercaptoetanol 5% y glicerol 10%

Procedimiento

Se utilizaron tubos de 13 cm de largo X 3 mm de ancho, se enjuagaron en la solución de SDS al 5%, se secaron en la estufa, se sellaron los tubos en uno de los extremos. , se marcaron a una altura de 1 cm, se preparó la solución A y se desgasificó durante 10 minutos, se llenaron hasta la marca y se adicionaron 10 μ l de agua sobre cada gel, se dejó polimerizar. Se enjuagaron y se eliminó el agua con papel absorbente y se eliminó el parafilm, se colocaron 10 μ l de la solución B y encima de ésta 10 μ l de la solución C, se llenaron los pozos con solución D. Se montó el equipo de electroforesis, el recipiente inferior se llena con la solución E y el superior con la D. se recorrieron a: 200 V 30 min, 300 V 30 min y a 400 V 1h.

Al finalizar la recorrida, se eliminó la solución D, así como las soluciones que estaban encima de los pozos, se enjuagó con 20 μ l de agua , el agua se seco con papel absorbente. La muestra se aplicó, después se colocaron 10 μ l de la solución B y 10 μ l de la C. Se dejó correr a 400 V por 5h. Posteriormente se dejaron los geles en la solución F. Finalmente se corrieron los geles en placa de una dimensión, se tiñeron con azul de Coomassie y se destiñeron.

9) Técnica en dot blot

Se siguió el método descrito por Towbin,1979.

Soluciones

Amortiguador base TBS:

0.15 M NaCl y 50 mM Tris, pH 7.4

Solución de saturación

0.05 % Tween, 5% leche descremada en TBS

Solución de revelado

22 mg de 4-cloro-1-naftol, 11 ml metanol, 33 ml de TBS y 44 μ l H₂O₂ al 30 %

Para la realización de los dots se cuantificó la proteína por el método de Bradford. Se cortó una membrana de nitrocelulosa del tamaño del

aparato de slot blot (Hoefer Scientific Instruments, modelo PR600), se humedeció en el tampón de transferencia y se montó el aparato. En cada pozo del aparato de slot blot se cargaron las proteínas en distintas concentraciones, se extrajo el amortiguador con vacío y se dejó durante aproximadamente 2 horas en estas condiciones. Posteriormente la membrana se incubó con la solución de saturación durante un mínimo de una hora a temperatura ambiente y con agitación. Se lavó en dos ocasiones con TBS (0.15 M), se incubó con el anticuerpo (dilución 1:50 para el anticuerpo anti proteínas ácidas. Este anticuerpo fue donado por el Dr. J.P.G. Ballesta de la Universidad Autónoma de Madrid, y 1:1000 para el anticuerpo anti-proteínas de la subunidad grande, obtenido en conejo, hechos en el laboratorio por Olivia Sánchez) en solución de saturación con agitación durante dos horas a 37 °C o toda la noche a 4 °C. El filtro se lavó con TBS (0.15 M); después con TBS (1 M) y nuevamente con TBS (0.15 M). Se incubó la membrana con el segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa en la solución de saturación, con agitación a temperatura ambiente, se lavó dos veces con TBS (0.15 M); el revelado se realizó con el sustrato de la peroxidasa, el 4-cloro-1-naftol; el producto de la reacción, un precipitado azul apareció en los primeros cinco minutos. La reacción se para diluyendo con agua.

10) Técnica de western en réplica de geles.

Soluciones

Solución 1 o anódica: Tris 0.3 M pH 10.4 en 20% de metanol

Solución 2 o anódica: Tris 25 mM pH 10.4 en 20% de metanol

Solución 3 o catódica: 10 mM 6-amino-n-hexano capríco en 20% de metanol

Solución de transferencia: 20 mM Tris, 150 mM glicina en 20% metanol.

Amortiguador base TBS: 0.15 M NaCl y 50 mM Tris, pH 7.4

Solución de saturación: 0.05 % Tween y 5% leche descremada en TBS

Rojo de Ponceau: 0.1 % de Rojo de Ponceau en 1% de ácido acético

Solución de revelado: 22 mg de 4-cloro-1-naftol, 11 ml metanol, 33 ml de TBS y 44 μ l H_2O_2 al 30 %.

Una vez realizada la electroforesis, el gel de acrilamida se lavó con el amortiguador de transferencia, se cortó una membrana de nitrocelulosa del mismo tamaño del gel y se enjuagó con el amortiguador de transferencia y se realizó la transferencia semi-seca. Se mojó el grafito con agua, se colocaron 3 papeles humedecidos en solución 3, el gel, el papel de nitrocelulosa, tres papeles humedecidos en solución 2 y seis papeles embebidos en solución 1, estos últimos sobre el grafito. El papel puede ser filtro o Whatman 3 MM. Se corrió a 1 mA/cm^2 de gel por hora. Después de la transferencia se tiñó el gel con azul de Coomassie y la membrana con rojo de Ponceau de 1 a 3 minutos y se destiñó con agua.

Posteriormente la membrana se incubó con la solución de saturación durante un mínimo de una hora a temperatura ambiente y con agitación. Se lavó en dos ocasiones con TBS (0.15 M), se incubó con el anticuerpo (dilución 1:50 para el anticuerpo anti proteínas ácidas de levadura y 1:1000 para el anticuerpo anti-proteínas de la subunidad grande) en solución de saturación con agitación durante dos horas a 37°C o toda la noche a 4°C . El filtro se lavó con TBS (0.15 M), después con TBS (1 M) y nuevamente con TBS (0.15 M). Se incubó la membrana con el segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa en la solución de saturación, con agitación a temperatura ambiente, se lavó dos veces con TBS (0.15 M). El revelado se realizó con el sustrato de la peroxidasa el 4-cloro-1-naftol. El producto de la reacción, un precipitado azul, apareció en los primeros cinco minutos. La reacción se detuvo diluyendo con agua.

Resultados

En el presente trabajo se estudió la caracterización de las proteínas ácidas del ribosoma mediante su aislamiento utilizando una concentración elevada de cloruro de amonio; la definición de su carácter ácido, y su pI y el estado de fosforilación, además del estudio del posible papel regulatorio de estas proteínas durante la germinación.

1. Extracción y purificación de ribosomas de ejes embrionarios de maíz.

Uno de los aspectos importantes para la obtención posterior de proteínas ribosomales ya sea totales o ácidas fue el obtener ribosomas puros y con buen rendimiento. La manera de conocer si los ribosomas son puros es calculando la relación de absorbancias a 260/280 de los ribosomas. Este cociente considera tanto la absorbancia a 260 que indica la longitud de onda a la cual absorben las bases nucleotídicas que componen al ARN ribosomal, correspondiendo este a las dos terceras partes del ribosoma, como a los aminoácidos aromáticos de las proteínas ribosomales que absorben a 280 nm y que corresponde a la tercera parte restante.

Se presenta en la tabla II las relaciones de absorbancia 260/280 reportada por Delaunay, y cols., 1972 para ribosomas de diversos tejidos en una gran variedad de organismos eucariotes. El último valor fue reportado por Speeding, 1989.

Tabla II

Relación 260/280 nm como criterio de pureza para ribosomas de diferentes tejidos en diversidad de organismos eucariotes.

	A 260/280
Humano (placenta)	1.74
Puerco de guinea (hígado)	1.75
Ratón (hígado)	1.70
Lagarto (hígado)	1.52
Rana (hígado)	1.56
Arenque (hígado)	1.77
Macarela (hígado)	1.83
Cangrejo (hepatopáncreas)	1.88
Ostra (hepatopáncreas)	1.75
Frijol (puntas de raíz)	1.80
Lenteja (puntas de raíz)	1.70
Maíz (puntas de raíz)	1.80
Espinaca (cloroplasto)	1.78-1.88

Para la obtención de los ribosomas, a partir de los cuales se extrajeron las proteínas en estudio, se utilizó un colchón de sacarosa 0.5 M con 0.5 M de KCl. Con estas concentraciones se eliminaron factores protéicos que están unidos a los ribosomas. Las moléculas más frecuentemente unidas al ribosoma son factores del proceso de traducción, como son los factores de iniciación, elongación y terminación. Estas proteínas no son constitutivas del ribosoma y por tanto pueden conducir a consideraciones falsas cuando se analizan los componentes estructurales del ribosoma.

En el caso propio se conoce que el pasar los ribosomas por un colchón de sacarosa 0.5 M y KCl 0.5 M, permite obtener solamente a las proteínas constitutivas del ribosoma.

En la tabla III se muestran algunos de los valores del cociente 260/280 obtenidos durante las extracciones que se realizaron a lo largo de los distintos experimentos.

Tabla III
Criterio de pureza para ribosomas de ejes embrionarios de maíz.

No. Experimento	260 nm	280 nm	260/280
1	0.408 + 0.11	0.225 + 0.07	1.81
2	0.475 + 0.09	0.258 + 0.10	1.84
3	0.507 + 0.15	0.275 + 0.11	1.83
4	0.485 + 0.13	0.270 + 0.08	1.79
5	0.493 + 0.16	0.226 + 0.13	1.80

El valor promedio del cociente 260/280 que se obtuvo de las diferentes extracciones fue de 1.81 el cual resulta ser un valor que se encuentra dentro del rango que reportan Delaunay y Spedding de 1.78-1.88 para ribosomas puros de plantas (Tabla II). Lo anterior indica que se trabajó con muestras de ribosomas de pureza aceptable; es necesario considerar que el rango de pureza es amplio tomando en consideración que los valores varían dependiendo del tejido y el organismo de donde los ribosomas fueron extraídos, además del método de obtención de ribosomas.

2. Patrones electroforéticos y de fosforilación de proteínas ribosomales de ejes embrionarios de maíz.

Los ejes de los distintos tratamientos (ejes embrionarios de maíz incubados durante 3, 8 y 24 horas) fueron incubados en el medio Murashige-Skoog y recibieron durante la última hora de incubación un pulso con ^{32}P . ortofosfato (125 μCi por cada 200 mg de ejes secos).

Los períodos utilizados para la observación del fenómeno fueron elegidos arbitrariamente, a excepción del último tiempo, las 24 horas, por ser este el momento en el que las células meristemáticas de los ejes embrionarios de maíz reinician la división celular. De los ribosomas puros se extrajeron las proteínas totales del ribosoma con una mezcla de acetato de magnesio y ácido acético a 0 °C. Las proteínas fueron analizadas por medio de geles de poliacrilamida al 15% en presencia de SDS y teñidos con azul de Coomassie con el fin de definir el patrón electroforético de las proteínas ribosomales totales de los ejes embrionarios. La figura 10 panel A muestra que los patrones electroforéticos de las proteínas ribosomales de diferentes tiempos de germinación (3, 8 y 24 horas) no muestran diferencias en el número de bandas y no hay cambios significativos en la intensidad de las mismas. Las proteínas se encuentran dentro de un rango de masa relativa (Mr) de 14 a 67 kD. Sin embargo, Wool y cols., 1979 reportan masas relativas de las proteínas ribosomales totales entre 11 y 38 kD, lo cual podría indicar que las bandas que se observan con una Mr por encima de 38 kD son agregados de proteínas que se forman y requieren un tratamiento desnaturizante más severo para destruir los agregados y así mantenerlas separadas. También puede tratarse de algunas proteínas contaminantes que no se logran separar de los ribosomas después de pasarlo por el colchón de sacarosa.

En la mayoría de las células eucariotes la fosfoproteína ribosomal dominante es una proteína básica de la subunidad pequeña con Mr de 32 kD llamada S6 (Traugh, 1986). En cultivo de tejido de tomate (Scharf y Nover, 1982), en levadura (Zinker, 1976) también se ha

reportado la fosforilación de dos proteínas ribosomales de bajo peso molecular.

En el presente trabajo, la fosforilación *in vivo* de las proteínas ribosomales de ejes embrionarios germinados durante el período comprendido entre las 3 y las 24 horas mostró tres bandas fosforiladas predominantemente (ver la figura 10, panel B) y otras con menor intensidad.

Las bandas fuertemente fosforiladas representan a proteínas ribosomales con Mr de 37, 15 y 15 kD, estas dos últimas bandas corresponden a las reportadas para tejidos vegetales por Scharf y Nover, 1982. El recambio del ortofosfato marcado de estas proteínas a lo largo de la germinación no presenta el mismo comportamiento en las tres proteínas fosforiladas, ya que éste es más activo durante las primeras horas en las bandas de 15 y 16 kD y al ir avanzando en el tiempo de germinación el recambio fue disminuyendo, sin embargo, la intensidad del fosfato incorporado en la proteína de 37 kD no presenta esta tendencia.

En cuanto al comportamiento de la proteína ribosomal de 37kD al inicio muestra un alto grado de fosforilación, lo que indica que al inicio todas sus posiciones están desfosforiladas y al dar el pulso con ortofosfato marcado, observamos fosforilada a la proteína.

Aparentemente a las ocho horas

La proteína de 32 kD que correspondería a la proteína reportada como S6 no aparece fosforilada, esto podría deberse a:

1. Que la proteína desde el inicio se encuentre fosforilada.
2. Que las proteínas responsables de la fosforilación y desfosforilación no se encuentren presentes o bien que no esten activas.
3. O bien que sea un mecanismo específico de desarrollo.

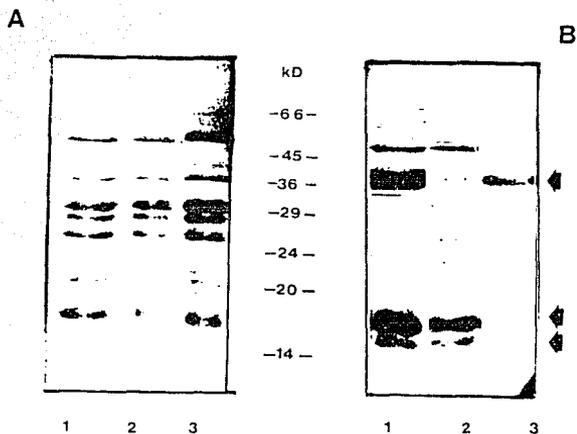


Figura 10. Gel de poliacrilamida y autorradiografía de proteínas ribosomales totales de ejes embrionarios de maíz en a lo largo de la germinación.

El panel A representa un gel desnaturizante con SDS al 15% en una dimensión. Las proteínas ribosomales totales fueron extraídas con acetato de magnesio y ácido acético. Todos los carriles fueron cargados con 50 μg de proteínas ribosomales. El carril 1 corresponde a las proteínas ribosomales totales de 3 h, el carril 2, a las proteínas ribosomales totales de 8 h, y carril 3 a las proteínas ribosomales totales de 24 h. El panel B corresponde a la autorradiografía del gel, los carriles presentan la misma correspondencia que en el panel A. La placa fue expuesta durante 15 días.

3. Purificación de proteínas ribosomales ácidas de ejes embrionarios de maíz.

La figura 11 ilustra la secuencia de pasos que fueron seguidos para la obtención de las proteínas ribosomales ácidas. Esta figura muestra un gel desnaturizante de poliacrilamida al 15% en una dimensión teñido con azul de Coomassie (panel A).

En el primer carril de la figura 11 se presenta el corrimiento electroforético de las proteínas ribosomales totales, las cuales se extrajeron con el método de Ramjoué, (1977) en el cual se utiliza acetato de magnesio y ácido acético; en este primer carril pueden visualizarse la totalidad de las proteínas del ribosoma que corresponden a un número aproximado de 20 bandas. Aunque el número de bandas que se observa es bajo, esto se debe a que la placa fue corrida en una dimensión y que en un momento dado cada una de las bandas puede corresponder a más de una proteína.

Intentando determinar la identidad de las fosfoproteínas del ribosoma que tienen un recambio diferencial del grupo fosfato, se procedió a tratar a los ribosomas con un amortiguador que tiene una concentración final de 0.75 M de cloruro de amonio en etanol al 50%.

La aplicación de este procedimiento a ribosomas de ejes embrionarios de maíz rinde a 0 °C, una fracción de proteínas que resultan ser las proteínas menos fuertemente unidas al ribosoma.

Sí el tratamiento se realiza a 37°C este procedimiento logra extraer no sólo a las proteínas P1 y P2, las cuales son las proteínas fosforiladas de 15 y 16 kD, sino también a L1; L5, L6, L10, L11, L16, L31 y L33. Si este procedimiento se realiza con la subunidad grande del ribosoma y 1 M de cloruro de amonio a 0°C se extraen selectivamente a las proteínas ácidas (Nierhaus, 1990).

Después del tratamiento con cloruro de amonio en etanol se observa en el carril 2 de la figura 11 de 8 a 11 proteínas aproximadamente, de las cuales algunas resultaron ser proteínas con carácter básico. Observaciones similares se han hecho con ribosomas de hígado de rata (Reyes y cols, 1977).

Aunque este procedimiento aparentemente no logró una extracción exclusiva de las proteínas en cuestión, resultó ser un buen paso antes de su completa purificación.

Se sabe por antecedentes en la literatura que las proteínas que corresponden a P1 y P2 presentan carácter ácido; así una herramienta útil para su purificación y para definir el carácter ácido fue el utilizar un lote (batch) con carboximetil celulosa a pH 6 a la cual se unieron las proteínas básicas y dejaron libres a las proteínas con carácter ácido (Figura 11 carril 3).

Así, la fracción obtenida después del tratamiento con la mezcla etanólica-amónica se colocó sobre la resina de carboximetil celulosa activada, la cual por ser un intercambiador catiónico permitió que se obtuvieran solamente a las proteínas con carácter ácido provenientes de los ribosomas.

La fracción de proteínas ácidas se define como la fracción protéica que no es retenida en la resina de carboximetil celulosa se obtienen solamente dos bandas de Mr de 15 y 16 kD (Figura 11 carril 3).

Por medio de la autorradiografía se puede observar el comportamiento de fosfoproteína por la incorporación de ^{32}P a las proteínas. Este carácter puede ser observado en el panel B de la figura 11 donde aun después de los diferentes pasos de purificación se mantiene preferentemente la fosforilación de las proteínas ribosomales de 15 y 16 kD.

Con el fin de tener la identificación completa se realizaron geles en dos dimensiones. Para la primera dimensión se utilizaron anfólinas en un rango de pH de 2.5 a 5. Las proteínas fueron localizadas muy cerca del extremo de pH 5 observándose como dos manchas de masa relativa de 15 y 16 kD (Figura 12).

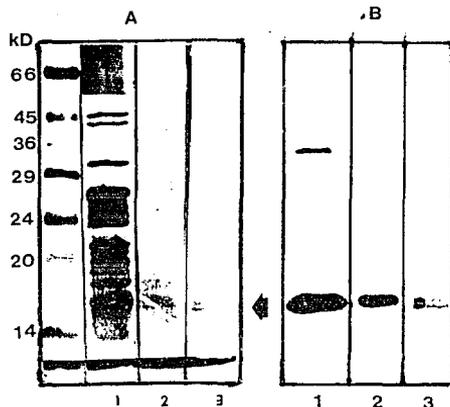


Figura 11. Análisis electroforético de los pasos de purificación de las proteínas ribosomales ácidas de ejes embrionarios de maíz
 Patrones electroforéticos de los tres pasos de purificación de las proteínas ácidas del ribosoma de ejes embrionarios germinados durante tres horas. A) Geles de poliacrilamida al 15% con SDS, teñidos con azul de Coomassie y B) Autorradiografía. Carril 1 Proteínas ribosomales totales extraídas con acetato de magnesio y ácido acético (50 μ g de proteína). Carril 2 Proteínas ácidas del ribosoma extraídas con cloruro de amonio y etanol (25 μ g) y Carril 3 Proteínas obtenidas del paso anterior y cromatografiadas a través de una columna de carboximetil celulosa (15 μ g). La autorradiografía fue expuesta durante 25 días.

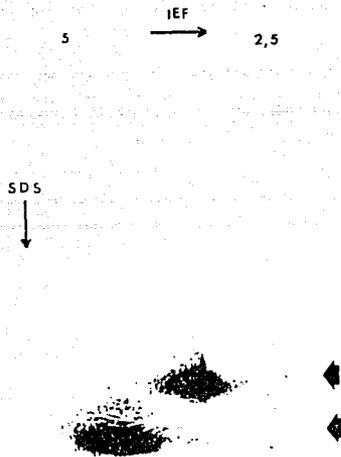


Figura 12. Evidencia electroforética de la pureza de las proteínas ribosomales ácidas. Las proteínas ribosomales ácidas fueron extraídas de acuerdo al método descrito. La primera dimensión se realizó en un rango de pH 2.5 a 5 y la segunda dimensión correspondió a un gel desnaturalizante con SDS y teñido con nitrato de plata.

4. Determinación de los residuos de aminoácidos fosforilados *in vivo* de las proteínas ácidas de ribosomas de ejes embrionarios de maíz.

Las proteínas ácidas del ribosoma marcadas *in vivo* con ^{32}P -ortofosfato, fueron aisladas de los ribosomas e hidrolizadas y analizadas por cromatografía en sílica gel en capa fina y autorradiografiadas. Los hidrolizados contenían residuos de fosfoaminoácidos marcados los cuales migraron durante la electroforesis, al igual que los estándares de o-fosfoserina, o-fosfotreonina y o-fosfotirosina.

Los resultados muestran tres "manchas", la primera de ellas tomando como punto de referencia el origen donde se aplicó la muestra corresponde a la fosfotirosina, la segunda a la fosfotreonina y la tercera a la fosfoserina. Los fosfoaminoácidos encontrados en las proteínas ribosomales ácidas son fosfotreonina y fosfoserina los cuales se observan en la autorradiografía (Figura 13 panel A). Se observa también una buena parte de fosfato radiactivo inorgánico (Figura 13, mancha IV), esta última probablemente fue incrementada por la hidrólisis de uniones fosfoéster.

Para determinar si el fósforo unido a los residuos de serina y treonina están covalentemente unido, las proteínas fueron tratadas con fosfatasa alcalina por un período de 60 min. y se observa en la figura 14 panel C que aproximadamente un 80% de fósforo radiactivo fue eliminado de la preparación; así los resultados confirman que la radiactividad estaba como fosfato monoéster.

De lo anterior se concluye que los residuos de aminoácidos fosforilados en las proteínas ribosomales ácidas son los de serina y treonina y que además los grupos fosfato transferidos a proteínas ribosomales ácidas están covalentemente unidos a estos dos residuos de aminoácidos.

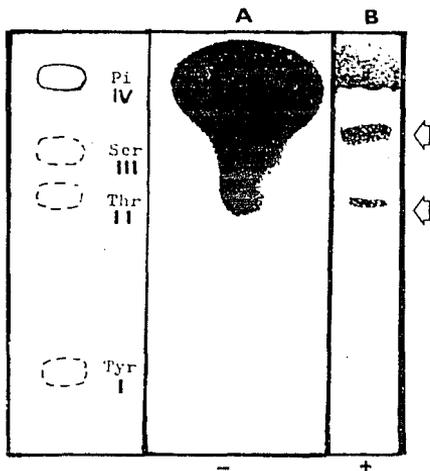


Figura 13. Autorradiografía del hidrolizado ácido de los aminoácidos de las proteínas ribosomales ácidas. Dosecientos microgramos de las proteínas ácidas del ribosoma fosforiladas *in vivo* fueron hidrolizadas con HCl 6N, durante dos horas a 80°C. El hidrolizado fue separado por medio de electroforesis en placas de sílica gel con alto voltaje (400V). El recuadro A corresponde a la hidrólisis de proteínas ácidas del ribosoma y el B corresponde a la hidrólisis de estas proteínas previamente tratadas con fosfatasa alcalina, durante 1 hora a 37°C.

5. Determinación del punto isoelectrico de las proteínas ribosomales ácidas

La forma más directa de identificar a las proteínas ribosomales ácidas es a través de sus características de fosfoproteínas y de su pI. En el caso de las proteínas ácidas de ribosomas de ejes secos, tenía que variar el procedimiento de identificación porque se ha observado que se requiere dar un pulso con la molécula radiactiva y dependiendo de la duración del pulso se tendría un patrón de fosforilación diferente al de ejes de maíz quiescentes.

Así, se decidió realizar el mismo procedimiento de extracción para obtener los ribosomas de ejes secos y las proteínas ribosomales ácidas de ejes secos que el utilizado con ejes de tres horas.

Para determinar el pI de las proteínas ribosomales ácidas de distintos tiempos de germinación, incluyendo a los ejes secos, se utilizaron geles de poliacrilamida al 4%, en placa, al 2% de anfolinas con un rango de pH de 2.5 a 5 y teñidos con azul de Coomassie.

En la figura 14 se compara el perfil electroforético a través de un isoelectroenfoco obtenido de las proteínas ribosomales extraídas con cloruro de amonio-etanol de ejes secos y de tres horas. El patrón correspondiente a los ribosomas de tres horas muestra cuatro bandas con un pI de 4.9 a 4.7, este resultado concuerda con lo observado en el gel de dos dimensiones de la figura 13 y con lo reportado en la literatura para otras especies en cuanto a que se encuentra cercano a pH 5 (Vilella y cols., 1991 y Möller y cols., 1986). Sin embargo, el patrón correspondiente a los ejes secos mostró ausencia de las proteínas ribosomales con carácter ácido.

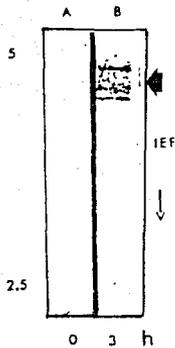


Figura 14. Isoelectroenfoque de proteínas ribosomales ácidas de ejes embrionarios secos y de 3 h de germinación.

Las proteínas se extrajeron de las partículas ribosomales con cloruro de amonio en etanol de los ribosomas de ejes embrionarios de maíz. El gel es de poliacrilamida al 4% en placa con un rango de pH de 2.5 a 5. Se utilizó como estándar a la mioglobina con un pI de 3.5. El carril A) corresponde a ejes embrionarios de cero horas de incubación (secos), y el carril B) a ejes embrionarios de tres horas de incubación.

6. Localización de las proteínas ribosomales ácidas a lo largo de la germinación.

Al establecer que las proteínas ácidas de ejes secos no se encontraban formando parte de la estructura del ribosoma, se procedió a definir su localización.

Para determinar la presencia de las proteínas ácidas de ejes secos se realizaron dot blots con proteínas ribosomales ácidas purificadas de 0 y 3 horas y proteínas provenientes del sobrenadante postribosomal de ejes embrionarios, con los mismos tiempos de incubación. Las proteínas del sobrenadante fueron precipitadas con acetona a -20°C durante toda la noche. El precipitado que se obtuvo se trató de la misma forma que el precipitado ribosomal para la obtención de las proteínas ácidas del ribosoma, es decir, se extrajeron con una mezcla de cloruro de amonio en etanol.

Se utilizó el anticuerpo policlonal de ejes embrionarios de maíz de 24 horas con una dilución de 1:1000 y anticuerpos anti-proteínas ribosomales ácidas provenientes de levaduras con una dilución de 1:500. Como control negativo se utilizó albúmina bovina.

Con el fin de determinar la reactividad de los anticuerpos con las proteínas ribosomales totales se procedió a realizar un western blot en donde se hizo reaccionar las proteínas totales de ribosomas de ejes embrionarios de 3h y los dos diferentes anticuerpos.

El western blot de la figura 15 ilustra el resultado de la reacción de los anticuerpos con las proteínas ribosomales totales.

El anticuerpo anti-proteínas de la subunidad grande reconoce de las proteínas ribosomales totales de ejes embrionarios de 3h a las proteínas correspondientes a la subunidad grande del ribosoma (figura 15 carril A).

La reacción inmunológica del anticuerpo anti-proteínas ribosomales ácidas de levadura con las proteínas ribosomales totales se puede ver en la figura 16 carril B. El resultado indica que este anticuerpo reconoce a cuatro bandas cuando se hace reaccionar con las proteínas ribosomales totales de ejes de 3h. Por la movilidad relativa y la reacción tan marcada que presenta con la banda de movilidad relativa más baja parece ser que esta banda es la reconocida como proteína ácida del ribosoma. Se considera que las otras bandas son fondo debido al título de anticuerpo tan bajo que se utilizó.

Una vez que se determinó la reactividad de ambos anticuerpos con las proteínas ribosomales totales de ejes embrionarios de 3h se procedió a determinar si la localización de las proteínas ribosomales ácidas de ejes embrionarios de cero horas estaba en el citoplasma.

La figura 16 nos representa un slot blot que muestra la reacción de los dos anticuerpos policlonales utilizados bajo las mismas condiciones que en el experimento antes descrito (anticuerpos anti-proteínas de la subunidad grande y anti-proteínas ribosomales ácidas de levadura) con las proteínas ribosomales ácidas extraídas con cloruro de amonio en etanol y cromatografiadas en carboximetil celulosa de ejes embrionarios de cero y tres horas.

Las proteínas del sobrenadante de ejes embrionarios de cero y tres horas fueron precipitadas y tratadas con el amortiguador que contiene cloruro de amonio y extraídas con etanol al 50% y pasadas por la resina catiónica. Las proteínas del sobrenadante final se precipitaron con acetona a -20°C durante toda la noche

La concentración de proteína se cuantificó en todos los casos por el método de Bradford, 1976.

En la figura 16 se observan los resultados de la reacción inmunológica de las proteínas ácidas del ribosoma y del citoplasma con los anticuerpos anti-proteínas de la subunidad grande y anti-proteínas ribosomales ácidas de levadura.

En la sección D de la figura 16 que corresponde a la reacción de las proteínas ribosomales ácidas extraídas de ribosomas de 3h, con el anticuerpo anti-proteínas ribosomales ácidas de levadura, se observa que este anticuerpo reconoce a las proteínas correspondientes a las proteínas ácidas en las partículas ribosomales como se esperaba.

En cambio, la reacción del anticuerpo anti-proteínas ribosomales ácidas de levadura con las proteínas extraídas de los ribosomas de cero horas (figura 16 panel C) es negativa, como ya se había observado previamente por medio del isoelectroenfoque (figura 14). y reacción positiva con las proteínas del citoplasma.

La información que nos revela el panel A es la existencia de proteínas de la subunidad grande en el sobrenadante y una reacción negativa con las proteínas aisladas de los ribosomas de ejes secos y una respuesta positiva con anticuerpos anti proteínas de la subunidad grande y las proteínas aisladas con cloruro de amonio-etanol y pasadas por la resina de carboximetil celulosa del sobrenadante lo cual indica que existen proteínas de la subunidad grande en ejes secos (cero horas de germinación) .La respuesta con la albúmina bovina es negativa en todos los casos.

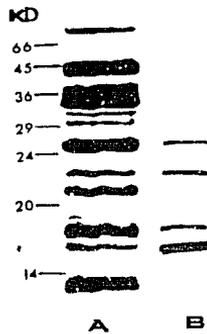


Figura 15. Inmunoréplica de proteínas ribosomales totales de ejes embrionarios de maíz.

Veinte microgramos de proteínas totales de ribosomas de ejes embrionarios de tres horas fueron cargados por carril y analizadas por geles de poliacrilamida al 15%, luego fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Las proteínas transferidas a la membrana de nitrocelulosa fueron reveladas con: A) Anticuerpo anti-proteínas de la subunidad grande de ejes embrionarios de maíz y B) con el anticuerpo anti-proteínas ribosomales ácidas de levadura

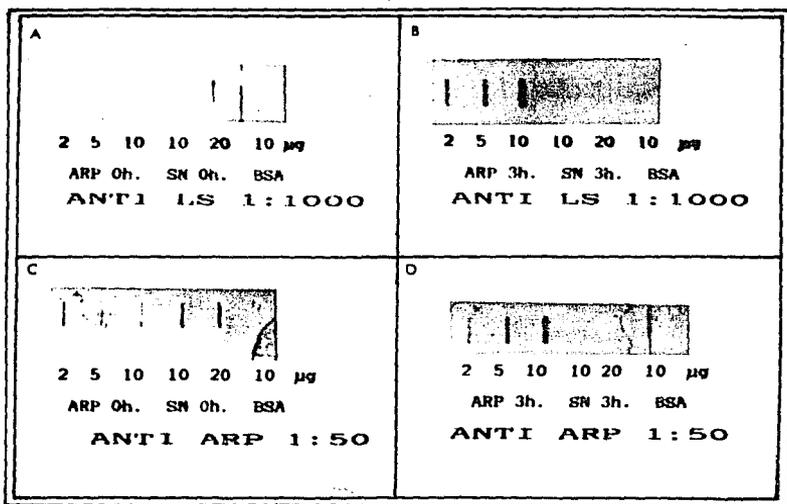


Figura 16. Slot blot de las proteínas ribosomales ácidas de ejes secos y ejes germinados durante tres horas.

En el slot blot se compara la localización de las proteínas ribosomales ácidas purificadas por cromatografía en carboximetil celulosa, obtenidas a partir de los ribosomas (ARP) y de la fracción protéica del SN (sobrenadante) de los ejes embrionarios quiescentes (Recuadros A y C) y de ejes embrionarios imbibidos durante tres horas (Recuadros B y D). Se colocaron diferentes concentraciones de proteínas ribosomales ácidas en cada ranura y fueron filtradas y retenidas en una membrana de nitrocelulosa. Se reveló con anticuerpos anti-proteínas de la subunidad grande, anti-LS, (Recuadros A y B) y el anticuerpo anti-proteínas ribosomales ácidas de levadura, anti-ARP (Recuadros C y D).

ESTA TESIS NO DEBE
 SER REPRODUCIDA
 SIN EL CONSENTIMIENTO
 DEL AUTOR

7. Efecto de la D-manosa sobre las fosforilación de las proteínas ribosomales ácidas.

Se postula que la afinidad que tienen las proteínas ácidas por el ribosoma depende de su fosforilación (Vidales, 1984 y Naranda, 1992) de tal forma que las proteínas ribosomales ácidas fosforiladas son las que están integradas al ribosoma.

Por otra parte, se sabe que el azúcar D-manosa depleta la poza de ATP por medio de una reacción de competencia (Walker y Sivak, 1985). Con el fin de determinar si este evento se presentaba en los ejes embrionarios durante la germinación y si es necesaria la fosforilación para integrarse a los ribosomas se procedió de la siguiente manera:

Los ejes secos se incubaron en medio Murashige-Skoog con y sin D-manosa (250 mM) por tres horas. Durante la última hora de incubación se les dió un pulso con ^{32}P -ortofosfato. Después de este tratamiento se extrajeron los ribosomas y las proteínas ribosomales. Se corrió un gel de poliacrilaamida al 15%, se tiñó con azul de Coomassie y se expuso a una película sensible.

En la autorradiografía de la figura 17 se muestra que:

1. Los ejes embrionarios de tres horas cuando son tratados con D-manosa presentan menor grado de fosforilación en las proteínas ribosomales que los ribosomas no tratados.
2. Una disminución en la fosforilación se presenta a nivel de las proteínas ribosomales ácidas.

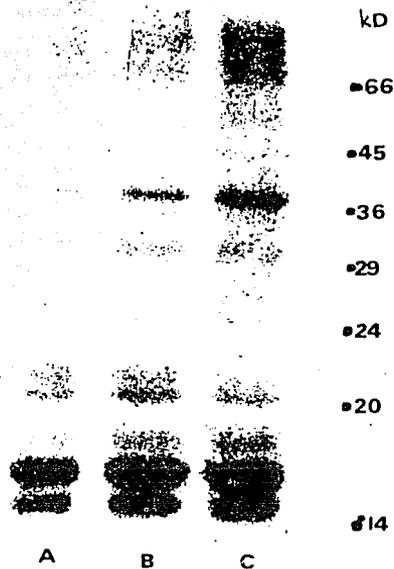


Figura 17. Efecto de la D-manosa sobre la fosforilación de las proteínas ribosomales totales de ejes embrionarios de maíz de tres horas.

Los ribosomas fueron incubados con A) D-manosa en medio Murashige-Skoog, B) Medio Murashige-Skoog y C) D-manitol en medio Murashige-Skoog por tres horas, durante la última hora se les dió un pulso con ^{32}P -ortofosfato (125 μCi por cada 200 mg de ejes embrionarios secos de maíz). Se extrajeron las proteínas ribosomales totales con acetato de magnesio y ácido acético y se analizaron las proteínas mediante un gel de poliacrilamida al 15%, se tiñó con azul de Coomassie y se destiñó. Posteriormente, se expuso a una película sensible Dupont por 15 días.

Las flechas rellenas indican las proteínas ribosomales de 15, 16 y 37 kD que fueron estudiadas previamente. Las flechas vacías señalan las proteínas ribosomales que también presentan la misma respuesta a la D-manosa. El azúcar D-manitol se utilizó como control de presión osmótica.

Discusión

En este trabajo por vez primera se reporta el aislamiento y la caracterización de las proteínas ácidas de ribosomas de plantas en particular en este caso, de ejes embrionarios de maíz.

Los datos aquí presentados indican que las proteínas ribosomales ácidas de ejes embrionarios son muy semejantes a las proteínas de otros organismos eucariotes en ciertas características. Las evidencias encontradas en este trabajo que apoyan esta conclusión son las siguientes:

- a) Rango de masa molecular relativa muy cercano al definido para otros organismos (Figura 10)
- b) Su carácter de fosfoproteína (Figuras 10 y 11)
- c) Su naturaleza ácida (Figuras 11 y 12)
- d) Su localización en la subunidad grande (Pérez-Méndez, 1991)
- e) Su reactividad con anticuerpos anti-proteínas ribosomales ácidas de levadura (Figura 15 y 16).
- f) La existencia de una poza de proteínas ácidas en el citoplasma (Figura 16).
- g) La fosforilación de los residuos de serina y treonina (Figura 14).

Algunas particularidades metodológicas advertidas durante el trabajo con las proteínas ribosomales ácidas de ejes embrionarios de maíz fueron: Se requirieron grandes cantidades de estas proteínas para ser visualizadas y fueron pobremente teñibles con azul de Coomassie por lo que se hizo difícil su caracterización, esto se debió probablemente a su propio carácter ácido el cual pudo ser la causa de una pérdida selectiva de los polipéptidos durante la extracción y manipulación.

De hecho, la cantidad de proteínas detectadas en geles de isoelectroenfoque no fue totalmente reproducible, lo cual sugiere un problema metodológico en la recuperación de las proteínas y se ha propuesto para ello el uso de HPLC para una mejor recuperación (Naranda y cols, 1993).

Las masas relativas calculadas para las proteínas ribosomales ácidas de organismos eucariotes como lo son las proteínas P1 y P2 de hígado de rata se han encontrado que son de 11,490 y 11,684 Da, respectivamente (Lin, 1982, Mitsui, 1988, Prieto, 1991 y Wool, 1991) y para las proteínas de levadura son de 10,947 (YP1 α) y 12,000 (YP2 β) Da (Naranda y Ballesta, 1991). En lo referente a las masas moleculares relativas encontradas para las proteínas ribosomales ácidas de ejes embrionarios, se calculó una Mr de 15 y 16 kD.

La masa relativa entre las proteínas ácidas de los distintos organismos puede variar por la forma en la cual se calcula la masa molecular relativa, en un caso por secuenciación de la estructura primaria y en el otro por el movimiento en geles de poliacrilamida, o bien, por su propia naturaleza. Como no hay datos en la literatura en relación a otras plantas actualmente no se podría diferenciar entre estas dos posibilidades.

En los organismos eucariotes se presenta la fosforilación de las proteínas ribosomales, pero se ha visto que la fosforilación *in vivo* afecta solamente algunos péptidos y que la fosforilación *in vitro* de estas mismas proteínas se da en todas las especies protéicas ribosómicas (Bailey-Serres,1991,Scharf and Nover,1982, Trewavas,1976, Vidales y cols., 1984, Wool,1979 y Zinker,1976).

A diferencia de los organismos eucariotes, en bacterias este tipo de modificación no se observa en las proteínas ribosomales (Zinker, 1984).

El hecho de que no se encuentren fosforiladas las proteínas de los ribosomas de bacterias y sí la de los organismos eucariotes sugiere que en organismos eucariotes además de la regulación que ejercen estas proteínas por su conformación en sí, también existe un control a través de fosforilaciones y desfosforilaciones de las proteínas ribosomales que resultan probablemente en una modulación de la velocidad de lectura de los distintos ARN mensajeros en la síntesis de proteínas, lo

cual introduciría una característica de selectividad en los ribosomas de eucariotes, tal vez realizada en forma diferente de los procariotes debido a las modalidades impuestas por la separación física y temporal entre la transcripción y la traducción en estos dos tipos de sistemas.

Además, la fosforilación de la proteína de la subunidad pequeña denominada S6 ha sido ampliamente estudiada por presentar esta proteína un recambio del grupo fosfato muy activo en presencia de factores de crecimiento (Haselbacher y cols.,1979) después de la fertilización de huevos de *Xenopus* (Bel, 1981), durante la maduración de oocitos de *Xenopus* (Hanocq and Bal, 1981). Además la fosforilación de esta proteína se sabe que precede al incremento en la síntesis de proteínas y la reentrada de la célula al ciclo celular (Thomas,1980).

La proteína S6 no es la única proteína que se fosforila *in vivo*, también se ha reportado la fosforilación de tres proteínas ribosomales de la subunidad grande con una masa relativa de 15, 16 y 37 kD en ribosomas provenientes de células en cultivo de tejido de tomate (Scharf and Nover, 1982), en *Artemia salina* (van Agthoven,1977), *S. cerevisiae* (Zinker, 1976), hígado de rata (Wool,1978) y en germen de trigo (Tao,1985). Estas observaciones han permitido establecer la

hipótesis de que el estado de fosforilación de los ribosomas eucariotes puede ser un punto de control en la actividad celular.

En el trabajo aquí realizado con ejes embrionarios de maíz se demostró así mismo, la fosforilación de tres proteínas que corresponden a las proteínas de 15,16 y 37 kD (Autorradiografías de las figuras 1 y 2 panel B). La autorradiografía de las proteínas ribosomales totales de ejes embrionarios de maíz muestra como la fosforilación de las proteínas de 15, 16 kD disminuye a lo largo de la germinación (ejes embionarios incubados desde 3h hasta 24h). Aunque estas proteínas no son las únicas que se fosforilan en este período, cualitativamente son las que presentan el cambio más evidente.

Aparentemente, *in vivo* se está presentando un control endógeno en la célula que modula la actividad de las enzimas proteína(s) cinasa(s) y/o proteína(s) fosfatasa(s) específicas de las proteínas ribosomales. En el caso específico de las proteínas ribosomales de ejes embrionarios de maíz, no se puede pensar en la carencia de la proteína responsable de la fosforilación ya que en presencia y ausencia de amanitina los patrones de fosforilación de las proteínas ribosomales son similares (Pérez-Méndez,1991).

La identificación de estas fosfoproteínas se refuerza por encontrar un patrón de fosforilación semejante al encontrado para las proteínas ribosomales de la subunidad grande (Pérez-Méndez, 1991).

Además de los puntos anteriores también se definió el carácter ácido de estas proteínas el cual fue determinado de varias formas.

La primera de ellas fue utilizando un método que extrae a las proteínas del ribosoma más externamente expuestas como lo son las ácidas. En este caso, se utilizaron los ribosomas completos a 0 °C y una concentración final de 0.79 M de cloruro de amonio (ver figura 11 carril 2); aunque este procedimiento no logró una extracción exclusiva de las proteínas en cuestión, resultó ser un buen paso previo para su posterior purificación.

Posteriormente, se utilizó una columna de carboximetil celulosa a pH 6 a la cual se unieron las proteínas básicas y dejaron libres a las proteínas con carácter ácido (ver figura 11 carril 3).

La segunda estrategia utilizada para confirmar el carácter ácido de estas proteínas fue emplear geles en dos dimensiones de poliacrilamida al 4% con un rango de anfolinas de 2.5 a 5 y se localizaron muy cerca del extremo de pH 5 observándose dos manchas de masa relativa de 15 y 16 kD (Figura 12).

La tercer forma de definir su carácter ácido fue determinando el pI de las proteínas, a través de isoelectroenfoque con geles de poliacrilamida

al 4% con un rango de anfólicas de 2.5 a 5 en una dimensión. De aquí que se observan 4 bandas con valores pI desde 4.9 hasta 4.7 (Figura 14 , panel B)

La existencia de proteínas cinasas que fosforilan a las proteínas ribosomales ácidas ha sido reportada (Kudlicki, W y col., 1980 y Pilecki, M et al, 1992) y datos preliminares usando una de estas enzimas indican distintos grados de fosforilación *in vitro* para cada proteína, sugiriendo que una única cinasa no es responsable de la fosforilación de todas las posibles posiciones fosforilables de las proteínas ácidas.

Es de interés hacer notar que las proteínas ácidas de *A.salina* (van Agthoven,1977) e hígado de rata (Hasler,1991) son fosforiladas en el último residuo de serina, alrededor de la posición 100, cercana al extremo carboxilo terminal. Este residuo se ha encontrado que está altamente conservado, y aún no se sabe con exactitud cual es la proteína cinasa que fosforila *in vivo* a esta posición de las proteínas.

Genot y cols.,(1978) observaron la fosforilación de las proteínas ribosomales ácidas por cinasas asociadas a polisomas; sin embargo, esta actividad no es localizada en ribosomas purificados.

También se ha encontrado que las proteínas ácidas del ribosoma pueden ser fosforiladas *in vitro* por una proteína cinasa denominada caseína cinasa del tipo II (CKII), una cinasa independiente de AMPc la cual puede utilizar tanto GTP como ATP (Issinger y cols.,1981).

También se ha observado que los residuos de serina en un ambiente ácido son generalmente buenos sustratos para la CKII (Amons y cols., 1982).

Por tanto se requiere mayor información acerca de los sitios fosforilables *in vivo* que sean relevantes para el proceso de traducción. Por otra parte hay reportes que indican que la proteína YP2b de *S.cerevisiae* se fosforila en la posición 19 y además muestra sitios potenciales de fosforilación para la CKII (SXXD/E o SXXXD/E) (Naranda,1991).

Otro punto que apoya la identificación de estas proteínas fue la determinación de los residuos de aminoácidos fosforilados (figura 5). Los residuos de aminoácidos fosforilados en las proteínas ribosomales ácidas de ejes embrionarios de maíz corresponden a los residuos de serina y treonina siendo el residuo de serina ligeramente mayor que el de treonina. Este resultado se encuentra en concordancia con los datos que reporta Vidales, (1984) para las proteínas ribosomales de *S.cerevisiae*.

Un hallazgo importante en la caracterización de estas proteínas durante la germinación fue la localización de una poza de proteínas ácidas en el citoplasma de ejes secos . Aunque la mayoría de las proteínas ribosomales se encuentran exclusivamente en los ribosomas

o en el nucleólo, una poza citoplasmática de proteínas ribosomales ácidas libres ha sido encontrada en *E.coli*, *S.cerevisiae*. *A. salina* y cultivo de células de HeLa en estado estacionario (Rich, B y Steitz, J, 1987). Este hecho parecería ser una forma de control traduccional . Por esto resulta interesante encontrar que cuando la semilla de maíz sufre el proceso de secado se separan las proteínas ribosomales ácidas ya que esos ribosomas no están activos en traducción y lo contrario ocurre con la imbibición al inicio de la germinación.

A continuación se propone un modelo para explicar el mecanismo que podría dar origen a la fosforilación diferencial de las proteínas ácidas de ejes embrionarios a lo largo de la germinación.

En el caso de los ejes quiescentes de maíz, en donde existe preferentemente una población de monosomas (Sánchez de Jiménez, 1981) y en donde los ribosomas se encuentran deficientes de proteínas ribosomales ácidas (figura 14) las proteínas definidas como proteínas ácidas del ribosoma se encuentran desfosforiladas y en el citoplasma y es durante las primeras horas de la germinación cuando las proteínas ácidas del ribosoma, que se localizan en el citoplasma, se fosforilan e inmediatamente se integran a las partículas 80S, las cuales se enganchan a un ARNm y forman polisomas, para dar lugar a la síntesis activa de proteínas.

Para determinar si la fosforilación de las proteínas ácidas del ribosoma es importante en la unión al ribosoma se trataron a los ejes embebidos

3h con D-manosa (secuestrador de grupos fosfato), los resultados preliminares obtenidos indican que el azúcar disminuye la fosforilación de estas proteínas, aunque aún es necesario realizar otros experimentos para determinar si hay una disminución en la cantidad de proteínas ribosomales ácidas en el ribosoma.

Conclusiones

Los resultados del trabajo realizado enfatizan el hecho de la fosforilación de las proteínas ribosomales.

Particularmente las proteínas ribosomales de ejes embrionarios de maíz de 15 y 16 kD presentan una fosforilación diferencial a lo largo de la germinación. Además corresponden a las proteínas ribosomales ácidas por sus características fisicoquímicas e inmunológicas (corrimiento electroforético, pI, cruzamiento con anticuerpos antiproteínas ribosomales de la subunidad grande de ejes de maíz y antiproteínas ribosomales ácidas de levaduras, su carácter ácido y de fosfoproteína).

Considerando la germinación de ejes embrionarios de maíz como modelo de estudio e integrando los datos obtenidos acerca de la identidad de las fosfoproteínas se concluye que este evento de fosforilación es un mecanismo específico de desarrollo.

Para comprender mejor el fenómeno de la fosforilación de las proteínas ribosomales ácidas durante la germinación existen problemas importantes que quedan aún por resolver entre ellos:

A. Determinar los perfiles de los ribosomas y definir si las proteínas ribosomales ácidas se encuentran unidas o no a partículas

60S monosomas o polisomas cuando la semilla de maíz presente el proceso de secado y a lo largo del proceso de germinación.

B. Otro punto importante por resolver es definir en las proteínas ribosomales ácidas de maíz las posiciones dentro de la

estructura primaria capaces de ser fosforiladas para conocer con mayor certeza si las posiciones influyen la región amino o carboxilo terminal de estas proteínas y entender si el mecanismo de regulación se lleva en una u otra región.

C. Otro problema a resolver es determinar si las proteínas ácidas del ribosoma de ejes embrionarios de maíz se encuentran codificadas por distintos genes o uno solo, y que sea una modificación posterior la que de origen a las dos proteínas.

Literatura citada

- Amons, R., Pluijms, W., Kriek, J., Moller, W.** 1982. The primary structure of eL12'/eL12'-P from the large subunit of *Artemia salina* ribosomes. FEBS Lett. 146:143-147.
- Bailey-Serres, J and Freeling, M.** 1990. Hypoxic stress-induced changes in ribosomes of maize seedling roots. Plant Physiol. 94:1237-1243.
- Bewley, J.D. y Black, M.** 1985. Seeds. Physiology of Development and Germination. Plenum Press. New York. 156-173.
- Bidwell, R.G.S.** 1974 Plant Physiology. McMillan, P.C., New York.
- Bradford, M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein -dye binding. Anal. Biochem. 72:248-254.
- 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.
- Delaunay, J., Mathieu, C. and Schapira, G.** (1972). Eur. J. Biochem. 31:561-564.
- Dholakia, J.N. y Wahba, A.J.** 1988. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:51-54.
- Duncan, R.F. y Hershey J.W.B.** 1987. Mol. Cell. Biol. 7:1293-1295.
- Esau, K.** 1977. Anatomy of seed plants. Segunda edición. John Wiley and Sons. Inc. New York. ISBN 0-471-02251-9.
- Hanocq-Quertier, J and Baltus, E.** 1981. Phosphorylation of ribosomal proteins during maturation of *Xenopus laevis* oocytes. Eur. J. Biochem. 120:351-355.
- Haselbacher, G.K., Humbel, R.E. and Thomas, G.** 1979. Insulin-like growth factor: insulin or serum increase phosphorylation of ribosomal protein S6 during transition of stationary chick embryo fibroblasts into early G1 phase of the cell cycle. FEBS Lett. 100:185-190.
- Hasler, P., Brot, N., Wassbach, H., Parnassa, A. and Elkon, K.** 1991. Ribosomal proteins P0, P1 and P2 are phosphorylated by casein kinase II at their conserved carboxyl termini. J. Biol. Chem. 266:13815-13820.
- Hershey, J.B.W.** 1991. Translational control in mammalian cells. Annu. Rev. Biochem. 60:717-755.

Hershey, J.B.W. 1989. Protein phosphorylation controls translation rates. *J.Biol. Chem.* 254:20823-20826.

Hill, W.E., Dahlberg, A., Garret, R.A., Moore, P.B., Schlessinger, D., Warner, J.R. 1990. *The Ribosome. Structure, Function and Evolution.* En American Society for Microbiology. Washington D.C. ISBN 1-55581-020-9.

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

Ibarra, J 1990 Tesis de Maestría. Facultad de Química UNAM

Issinger, O.G. 1977. *Biochim. Biophys. Acta* 477:186-189.

Kudlicki, W., Szyszka, R., Palen, E. and Gasior, E. 1980. Evidence for a highly specific protein kinase phosphorylating two strongly acidic proteins of yeast 60S ribosomal subunit. *Biochim. Biophys. Acta* 633:376-385.

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

Lewin, B. *Genes IV.* Cell Press, Cambridge, 1990. ISBN 0-19-854268-4.

Lin, A., Wittmann-Liebold, B., Mc Nally, J. and Wool, I.G. 1982. The primary structure of the acidic phosphoprotein P2 from rat liver 60S ribosomal subunits. *J.Biol. Chem.* 257: 9189-9197.

Mac Connell, W. and Kaplan, N. 1982. The activity of the acidic phosphoproteins from 80S rat liver ribosomes. *J. Biol. Chem.* 257:5359-5366.

Marcus, A. 1982. Ribosomes, polysomes and the translation process. En Boulter, D. y Parthier, B. . *Encyclopedia of Plant Physiology.* Vol. 14A Cap. 3.

Marcus, A., Feeley, J. y Volcani, T. 1966. Protein synthesis in imbibed activation and polysome formation. *Plant Physiology* 41:1167-1172.

Mayer, A.M. and Poljakoff-Mayber, A. 1989. *The germination of seeds.* Pergamon Press. Oxford U.K.

Medina, E. 1977. *Introducción a la Ecofisiología Vegetal.* Ed. OEA. Cap. 2.

- Mitsui, K.** and Tsuguri, K. 1988. cDNA and deduced amino acid sequence of 38 kDa-type acidic ribosomal protein A0 from *S.cerevisiae*. Nucleic Acids Research 16:3573.
- Mitsui, K.** and Tsuguri, K. 1988. cDNA and deduced amino acid sequence of 38 kDa-type acidic ribosomal protein A2 from *S.cerevisiae*. Nucleic Acids Research 16:3575.
- Möller, W.** and Maassen, J.A. On the Structure, function and dynamics of L7/112 from *E.coli* ribosomes. En Structure, function and genetics of the ribosomes. Cap. 17. Springer-Verlag New York, 1986.
- Murashige, T.** and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plantarum. 15:473-479.
- Nairn, A.** y Palfrey, H. 1982. J. Biol. Chem. 262:17299-17303.
- Naranda, T.** and Ballesta, J.P.G- 1991. Phosphorylation controls binding of acidic proteins to the ribosome. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10563-10567.
- Naranda, T.,** Remacha, M. and Ballesta, J.P.G- 1993. The activity-controlling phosphorylation site is not the same in the four acidic ribosomal proteins from *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol. Chem. 268:2451-2457.
- Nierhaus, D.A.** 1989. Capítulo 8 en Ribosomes and protein synthesis. IRL Press Oxford University. ISBN 0-19-963105-0.
- Nojima, Y.,** Minota, S., Yamada, A. and Takuku, F. 1989. Identification of an acidic ribosomal protein reactive with anti-SM autoantibodies. J. of Immunology 143:1915-1920.
- O'Farrel, P.H.** 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J Biol. Chem. 250:4007-4021.
- Pérez Méndez, A.** 1991. Tesis de Maestría. Facultad de Química. UNAM.
- Pérez, L,** Aguilar, R, Sanchez de Jimenez. 1987. Effect of an exogenous auxin on maize tissues. Alteration of protein synthesis and phosphorylation. Physiol. Plantarum 69:517-522.
- Pilecki, M.,** Grankowski, N., Jacobs, J and Gasior, E. 1992. Specific protein kinase from *Saccharomyces cerevisiae*. Eur. J. Biochem. 206:259-267.

- Prieto, J., Candel, E., and Coloma, A.** 1991. Nucleotide sequence of cDNA encoding ribosomal acidic phosphoprotein-P1 from *Dictyostelium discoideum*. Identification of a novel carboxy-terminal sequence in A-proteins. *Nucleic Acids Research* 19:1340.
- Ramjoué, H.P. and Gordon, J.** 1977 Evolutionary microdivergence of chicken and rat liver ribosomal proteins. *J. Biol. Chem.* 252:9065-9070.
- Ray, B., Brendler, T., Ady, A., Daniels-Mc. Queen, S., Kelven-Miller, J., Hershey, J., Grifo, J., Meerick, W and Thach, R.** 1983. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:663-667.
- Reboud, Genot, Cenatiempo and Cozzone.** 1978. Endogenous phosphorylation of ribosomal proteins from membrane-free rat liver polysomes. *FEBS Lett.* 86:103-107.
- Reyes, R., Vázquez, D. and Ballesta, J.P.G.** 1977. Peptidyl transferase center of rat liver ribosome cores. *Eur. J. Biochem.* 73:25-31.
- Rich, B.E. and Steitz, J.** 1987. Human acidic ribosomal phosphoproteins P0, P1 and P2: Analysis of cDNA clones, *in vitro* synthesis, and assembly. *Mol. and Cell Biol.* 7:4065-4074.
- Saenz-Robles, M.T., Remacha, M., Vilella, M.D., Zinker, S. and Ballesta, J.P.G.** 1990. The acidic ribosomal proteins as regulators of the eukaryotic ribosomal activity. *Biochimia et Biophysica Acta* 1050: 51-55.
- Salisbury, F.B. and Ross, C.W.** 1978. *Plant Physiology*. 2a. ed. Wadsworth Publishing Co. Belmont, USA.
- Santos, C., Ortiz-Reyes, B., Tatjana, N, Remacha, M. and Ballesta J.P.G.** 1993. The acidic phosphoproteins from *Saccharomyces cerevisiae* ribosomes. NH₂-terminal acetylation is a conserved difference between P1 and P2 proteins *Biochemistry* 32:4231-4236.
- Sánchez de Jiménez, E., Aguilar, R and López, S.** 1981. Distinctive characteristics of protein synthesis in maize embryos during the early stages of germination. *Biochem. and Bioph. Res. Comm.* (2):445-450.
- Sánchez de Jiménez, E. and Aguilar, R.** 1984. Protein synthesis patterns; relevance of old and new messengers RNA in germinating maize embryos. *Plant. Physiol.* 75:231-234.

Sánchez-Madrid, F., Reyes, R., Conde, P., and Ballesta, J.P.G. 1979. Acidic ribosomal proteins from eukariotic cells. *Eur. J. Biochem.* 98:409-416.

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

Seal, S., Giensen, M., Roman, R y Marcus, A. 1977. Functional characterization of the initiation factors of wheat germ. en Bogorad y Weil eds. *Nucleic Acids and protein synthesis in plants.* New York (167).

Simon, E.W. 1984. Early events in germination . Murray, D.R. *Seed Physiology.* Vol. 2 Cap. 3.

Sppeding, G. (1989). *Ribosomes and Protein Synthesis.* IRL Press Oxford University. Cap. I. ISBN 0-19-963105-0.

Strasburger, E., Noll, F., Schenck, H. and Schimper, A.F.W. 1974. *Tratado de Botánica.* 6a. edición. Ed. Marin, Barcelona.

Thomas, G., Siegmann, M., Kubler, A.M., Gordon, J. and Jimenez de Asua, L. 1980. Regulation of 40S ribosomal protein S6 phosphorylation in Swiss mouse 3T3 cells. *Cell* 19:1015-1023.

Towbin, H., Stachlein, T., Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from, acrylamide gels to nitrocelulose sheets procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4350-4354.

Traugh, J.A. and Pendergast, A.M. 1986. Regulation of protein synthesis by phosphorylation of ribosomal protein S6 and aminoacyl-tRNA synthetases. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 33:195-229.

Traut, R.R. Tewari, D., Sommer, A., Gavino, G.R., Olsen, H. and Glitz, D.G. 1986 Protein topography of ribosomal functional domains: Effects of monoclonal antibodies to different epitopes in *E. coli* protein L7/L12 on Ribosome function and structure. En *Structure, function and genetics of Ribosomes.* Cap. 17. Springer-Verlag. New York.

Trewavas, A. 1976. Post-translational modification of proteins by phosphorylation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 27:349-374.

Tsurugi, K., Collatz, K., Todoroko, K., Ulbrich, N., Lightfoot, X and Wool, Ira. 1978. Isolation of eukaryotic ribosomal proteins. JBC 253:946-955.

van Agthoven, A., Kriek, J., Amons, R. and Möller, W. 1978. Isolation and characterization of the acidic phosphoproteins of 60S ribosomes from *Artemia salina* and rat liver. Eur. J. Biochem. 91:553-565.

Vidales, F.J., Saenz'Robles, M.T. and Ballesta, J.P.G. 1984. Acidic proteins of the large ribosomal subunit in *S. cerevisiae*. Effect of phosphorylation. Biochem. 23: 390-396.

Vilella, M.A., Remacha, M., Ortiz, B.L., Mendez, E. 1991. Characterization of the yeast acidic ribosomal phosphoproteins using monoclonal antibodies-proteins L44/L45 and L44' have different functional roles. Eur. J. Biochem. 196:407-414.

Walker, D.A. and Sivak, M.N. 1986. Photosynthesis and phosphate: a cellular affair?. TIBS 17:176-179.

Wolfe, H.F. and Kay, C.M. 1967. Biochemistry 6:2853-2860.

Wool, I.G., Chen, Y.L. Gluck, A. and Sozuki, K. 1991. The primary structure of rat ribosomal proteins P0, P1 and P2 and a proposal for uniform nomenclature for mammalian and yeast ribosomal proteins. Biochimie 73: 861-870.

Wool, I.G. 1979. The structure and function of eukaryotic ribosomes. Ann. Rev. Biochem. 48:719-754.

Zinker, S. and Warner, J. 1976. The ribosomal proteins of *S. cerevisiae*. J. Biol. Chem. 251:1799-1807.

Zinker, S. 1990. P5/P5' the acidic ribosomal phosphoproteins from *S. cerevisiae*. Bioche. Bioph. Acta 606:76-82.