

00962

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

1
leg.



"ACTIVIDAD DIFERENCIAL DE SINTESIS DE PROTEINAS
DURANTE LA RESPUESTA A HERIDA EN Solanum
tuberosum L.

EJEMPLAR UNICO

T E S I S
Que para obtener el Grado de
Maestro en Ciencias Químicas (Bioquímica)
P r e s e n t a

YOLANDA COCOTLE RONZON

México, D. F.

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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

JURADO ASIGNADO

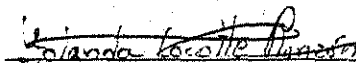
Presidente: DR. ALBERTO HAMABATA
1er. vocal: DRA. RUTH ROMAN P.
Secretario: DRA. IRMA BERNAL L.
Suplente: DR. ALFONSO CARABEZ
Suplente: DR. JORGE VAZQUEZ

Asesor del tema:



DRA. RUTH ROMAN P.

Sustentante:



Q.A. YOLANDA COCOTLE R.

Agradecimientos:

Al Departamento de Bioquímica Vegetal de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, por el apoyo brindado para la realización de la presente tesis.

A la Dra. Ruth Román P., por la asesoría proporcionada.

Al Ing. Manuel Jesús Villarreal G., Jefe del Programa de la papa, del CODAGEM, quien donó parte del material biológico utilizado.

A:

Virginia y Basilio

C O N T E N I D O

R E S U M E N

1.	I N T R O D U C C I O N	
1.1.	El fenómeno de herida o envejecimiento	2
	a) Bioquímica del proceso	4
1.2.	El sistema de herida como modelo de estudio ..	10
1.3.	Antecedentes	13
1.4.	Hipótesis y objetivos	18
2.	M A T E R I A L E S Y M E T O D O S	
2.1.	Reactivos utilizados	20
2.2.	Métodos	21
3.	R E S U L T A D O S	
3.1.	Establecimiento del sistema de herida	31
3.2.	Optimización del sistema de incorporación <u>in vitro</u> de aminoácidos marcados	38
3.3.	Comparación de las actividades ribosomales K ₃₀₀ y componentes del sobrenadante celular obtenido de 100 000 x g (S ₁₀₀)	42
3.4.	Efecto de la adición del lavado ribosomal K ₃₀₀ sobre los sistemas de incorporación <u>in</u> <u>vitro</u>	50
3.5.	Efecto de la adición del lavado ribosomal so- bre otro sistema de incorporación <u>in vitro</u> ..	63
4.	D I S C U S I O N	66
5.	B I B L I O G R A F I A	78

R E S U M E N .

El corte en tejidos de almacenamiento vegetal, inicia profundos cambios metabólicos en los componentes celulares de los mismos, siendo la síntesis de proteínas catalíticas y estructurales una de las características más necesarias y sobresalientes para que se pueda observar esta actividad metabólica.

Tratando de estudiar la causa del aumento en la síntesis de proteínas como respuesta al corte, en el presente trabajo utilizando tubérculos de papa y un sistema de traducción in vitro, se muestra que por medio de un lavado salino efectuado en la fracción ribosomal se puede poner de manifiesto que tanto la fracción citoplásmica como la ribosomal muestran un notable aumento en cuanto a su capacidad para estimular la síntesis de proteínas. En este mismo sistema durante el transcurso de la respuesta al corte, se ha encontrado además la presencia de un inhibidor de síntesis de proteínas presente en el lavado ribosomal mencionado, el cual pierde capacidad de inhibición durante la misma respuesta así como por almacenamiento y calor, con capacidad inhibitoria también sobre otro sistema de traducción como es el de germen de trigo y que esta actividad inhibitoria por evidencia diferencial pensamos no se debe exclusivamente a una actividad de proteasa presente también en el mismo lavado.

1. INTRODUCCION .

1.1. El fenómeno de herida o envejecimiento.

Aunque morfológicamente diferentes órganos de almacenamiento vegetal tales como raíces (zanahoria, camote) hipocotilos (betabel), tubérculos (papa) o rizomas (alcachofa), se distinguen por compartir un rasgo común: representan unidades de propagación cuyos tejidos se encuentran en estado latente, el cual bajo condiciones naturales es terminado solo por el proceso de la germinación; sin embargo, la transición de una célula en reposo de tales organos de almacenamiento a una célula activada con capacidades de desarrollo, puede ser fácilmente inducida a un tiempo cualquiera mediante el corte en pequeños fragmentos de los tejidos de almacenamiento y la incubación de los mismos en una atmósfera húmeda por algunas horas o días.

Esta activación comprende síntesis de ácidos nucleicos y su consiguiente transporte al citoplasma, dando como consecuencia la síntesis de proteínas estructurales necesarias para la formación de membranas celulares, ribosomas, plástidos y mitocondrias, así como la formación de enzimas que participan en diferentes vías metabólicas como son la degradación de polímeros de almacenamiento, la activación del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y un aumento en la respiración y síntesis

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



sis de ácidos grasos; todas estas actividades acompañadas por un concomitante proceso de desdiferenciación, llevando finalmente a una renovada rediferenciación de las células del tejido cortado (1). Es a todo este proceso inducido al que se le ha denominado en la literatura como envejecimiento (aging), lavado (washing) o herida (wounding).

Debido a que a menudo existe confusión con respecto al uso indistinto de los términos envejecimiento y senescencia y a que uno de los nombres que recibe el proceso que nos ocupa es precisamente envejecimiento, resulta útil el dar las siguientes definiciones: senescencia puede ser definida como aquellos procesos deteriorativos programados, que son causa natural de muerte, mientras que el envejecimiento por otra parte se refiere a aquellos que no necesariamente son causa de muerte aún cuando dichos procesos se acumulen con la edad. Así tenemos que el envejecimiento incluye un rango más amplio de cambios fisiológicos, algunos de los cuales pueden llevar al debilitamiento del organismo mientras que otros pueden ser completamente neutrales con respecto a la capacidad del mismo para sobrevivir; como ejemplos de envejecimiento tenemos los cambios fisiológicos en un vegetal los cuales causan su conversión de un brote a una planta joven, de una planta joven a una madura o a la gradual declinación del vigor con el aumento de la edad(2), en este sentido vamos a entender nuestro proceso.

a) Bioquímica del proceso.

Degradación de carbohidratos. En diferentes tejidos vegetales se ha observado que el incremento en la producción de azúcares solubles tales como hexosa y fosfato de hexosa está acompañada por un aumento en la producción de energía y la formación de sus precursores a través del catabolismo de carbohidratos. En tejidos no fotosintéticos tales como los tejidos de almacenamiento, el almidón es rápidamente degradado para producir azúcares solubles en respuesta a la herida mecánica, siendo visible al microscopio tal degradación entre las nueve y las doce horas después del corte en el caso de tubérculos de papa, no observándose almidón en estas células después de diez días. El proceso de la degradación es dependiente de O_2 e inhibida por iones HCO_3^- , asimismo la estimulación de la degradación de este polímero de almacenamiento en tejidos heridos, se ha adscrito parcialmente a un incremento en la actividad de las enzimas amilasa y fosforilasa, observándose que en tejido fresco tanto la alfa y beta amilasa como la fosforilasa están presentes en gran cantidad, sin embargo, sólo la actividad de la alfa amilasa es incrementada en respuesta a la herida(3).

Por otra parte en tejidos de almacenamiento como betabel y alcachofa, la accesibilidad de la sacarosa a la actividad de

La invertasa ácida (pH óptimo 4.6) en respuesta a la herida parece ser el punto inicial de la ruptura de carbohidratos resultando en la ya citada producción de azúcares reductores o sus monofosfatos. En otros tejidos de almacenamiento, el material usado para catabolismo es principalmente glucosa y fructosa y quizá rafinosa (1).

Activación de la vía glucolítica y de los fosfato de pentosa. Existen evidencias de que la actividad de la vía glucolítica en tejidos de almacenamiento vegetal, es estimulada en respuesta a la herida, manifestándose por un incremento en las concentraciones de los intermediarios de esta vía metabólica, así como un aumento en la actividad de varias enzimas involucradas en la misma, contándose entre estas a la fosfogliceromutasa y piruvato cinasa; observándose asimismo que los cambios en actividades de las enzimas glucolíticas son aparentemente dependientes de síntesis de proteínas, ya que la adición de cicloheximida o p-fluorofenilalanina a cortes de tejido fresco, previene cualquier aumento en su actividad(1).

La actividad de la vía de los fosfato de pentosa se manifiesta con un mayor incremento que el de la de glucolisis en respuesta a la herida de los tejidos de almacenamiento y resulta lógico ya que la vía de las pentosas es la que produce

precursores de ácidos nucleicos y fenilpropanoides cuya síntesis también aumenta en esta misma respuesta. La vía de pentosas, es fuente de compuestos reducidos, NADPH, coenzima requerida para reacciones de hidroxilación involucradas en la formación de algunos fenilpropanoides (ácido clorogénico, lignina) y terpenos. Por otra parte la vía de los fosfatos de pentosas puede contribuir significativamente a un aumento respiratorio a través del 3 fosfoglicerato, uno de los intermediarios, ya que este puede ser metabolizado a piruvato a través de los últimos pasos de la secuencia glucolítica, la activación de la vía de las pentosas se debe a un aumento en la cantidad de las enzimas involucradas (3).

Nucleotidos de adenina. En respuesta a la herida, en tejidos de almacenamiento de camote (4) el contenido de nucleótidos de adenina, es incrementado después de un retraso de varias horas aumentando también, aunque en pequeñas cantidades, los nucleótidos de guanina, citidina y uridina (3). En respuesta a la herida la suma de las formas oxidadas y reducidas de NAD y NADP puede ser aumentado y la relación de oxidadas a reducidas (NAD/NADH o NADP/NADPH) también puede elevarse. Por otra parte ya que mono y dinucleotidos de adenina toman parte como sustratos o efectores en varias reacciones enzimáticas involucradas en glucólisis, vía de los fosfato de pentosa, ciclo de los ácidos tricarbóxicos y sistema de transporte de electrones,

es probable que el aumento observado de la relación oxidadas a reducidas esté relacionado al aumento respiratorio resultante de la herida.

Aumento en la actividad de vías metabólicas que utilizan ATP. Este aumento en actividad, también controla la velocidad de respiración ya que causa la conversión de ATP a ADP el cual controla la síntesis de ATP a nivel sustrato y la fosforilación oxidativa (3). La síntesis de ARNm y ARNr así como ARN_t es estimulada con un retraso de alrededor de tres horas en tejido de camote (5). La síntesis de estas formas de ácido ribonucleico requiere energía química del ATP. Otro proceso que utiliza ATP es la síntesis de enzimas que acompaña a la herida.

Por medio de experimentos con radioisótopos, reacciones anti genó-anticuerpo e inhibidores de síntesis de proteínas se ha comprobado la formación de enzimas como son el caso de la demostración de que un aumento en la actividad de RNasa en camote con la herida se debe probablemente a una síntesis de novo de la misma, utilizando para tales experimentos el inhibidor cicloheximida (6) o la comprobación de la síntesis de novo de la enzima fenil alanil amonio liasa (7,8) tanto en papa como en tejido herido de camote.

Respiración. El aumento en la degradación del almidón con la concomitante activación de la vía de las pentosas, glucólisis y ciclo de los ácidos tricarboxílicos y las alteraciones en la cadena respiratoria llevan a un fuerte aumento en respiración de los cortes de tejido de almacenamiento sin importar su origen taxonómico. De acuerdo a lo que dice Kahl (1) este aumento respiratorio puede ser dividido en dos distintas fases: inicialmente un proceso de desbloqueo lleva a una activación de la respiración, el cual usa ácidos grasos como sustratos y no es dependiente de la síntesis de ARN y síntesis de proteínas y la segunda fase caracterizada por el típico incremento respiratorio, con la subsecuente declinación, que requiere tanto síntesis de proteínas como de ARN total.

Regulación hormonal. Las células del parénquima de los cortes de tubérculos de papa son capaces de reaccionar diferencialmente a la herida de acuerdo al medio ambiente en que sean incubados: 1. Formación de un periderma de herida seguido de la inducción de actividad mitótica y concomitante proceso de suberización cerca de la superficie de la herida, esto sucede cuando los fragmentos del tejido son guardados bajo condiciones atmosféricas normales. 2. Si los cortes son expuestos a un incrementado stress por agua (parcial desecación) la actividad mitótica es disminuida a favor de una

suberización más intensa. 3. Si la atmósfera externa a la que son expuestos los cortes es muy semejantes a la atmósfera interna del tubérculo intacto (alta tensión de agua y una concentración alta de CO_2) entonces no ocurre suberización, las células de la superficie herida de tales tejidos proliferan y ocasionalmente se divide mitóticamente y forma un tejido parecido a callo. A las hormonas vegetales se les ha propuesto como potenciales disparadores de varios procesos de herida incluyendo la división celular como un paso final y por otra parte, hay líneas de evidencia de que varios fitorreguladores juegan un papel clave en el proceso inducido por la herida: primero, todas están presentes en los sistemas vegetales investigados, por ejemplo, papa, zanahoria, camote y betabel; segundo, después de la herida incrementan en actividad lo cual no necesariamente implica que aumenten también en concentración; tercero, intervienen en gran número de procesos metabólicos diferentes si se aplican externamente (9) y lo más importante los fitorreguladores pueden estar involucrados en la regulación genética como lo demuestran estudios en los cuales se ha visto el involucramiento de la relación auxinas y/o giberelinas en el proceso de la mitosis, de las citocininas en la promoción de crecimiento proliferativo, la terminación de los procesos citológicos en la superficie herida por ácido absicico o la inducción de síntesis de proteínas, ARN y cambios en las proteínas histó-

nicas y no histónicas por efecto del ácido giberélico, quedando a la fecha mucho trabajo por realizar a nivel molecular (10).

1.2. El sistema de herida como modelo de estudio.

Desde fines de siglo pasado, cuando fueron observados los profundos cambios metabólicos y morfológicos de los cortes de tejido de almacenamiento a la fecha, se ha desarrollado una gran investigación con el fin de caracterizar a este fenómeno de herida, siendo importante como apunta Van Stevenick (9) el preguntarse la utilidad científica de la información basada en algo que podría parecer hecho bajo condiciones altamente artificiales, debido a que los estudios llevados a cabo podrían no necesariamente reflejar cambios asociados con el metabolismo y fisiología de la planta en general, sin embargo, son tan grandes las semejanzas encontradas en los procesos metabólicos en los cortes de tejido de almacenamiento con lo que se sabe ocurre en algunos aspectos regulatorios morfológicos de todas las plantas, que se ha aceptado como un buen modelo de estudio dentro de la Fisiología y Bioquímica Vegetal.

Así la citología de las células de estos cortes de tejido de almacenamiento puede dar información acerca tanto del ensamblaje como transformación de membranas (11), biogénesis de or-

ganelos (12, 13) o formación y modificación de pared celular (14, 15), en los últimos años en que ha estado sujeto a estudio el corte de estos tejidos se ha enfocado a aspectos principalmente de la regulación genética y metabólica en células que están diferenciándose (9), considerándose por lo tanto, al mismo como uno de los métodos más confiables y fácilmente reproducibles de inducir una cierta medida de diferenciación celular bajo condiciones controladas.

Un mejor entendimiento de los varios fenómenos bioquímicos que ocurren durante el curso de la herida, podrían ser utilizados en el mejoramiento de métodos de protección vegetal y producción de plantas resistentes a herida o patógenos ya que estos cortes son un buen modelo para el estudio del proceso herida-cicatrización y la relación planta-patógeno teniendo además que la reproducción de estas condiciones patológicas anormales provee muchas oportunidades para elucidar varios aspectos bioquímicos y fisiológicos generados en ausencia o presencia del patógeno tales como la síntesis y degradación de enzimas, regulación metabólica, transmisión de estímulos (16) y función de membranas.

Es Uratani et. al (10) quien utilizando al sistema de herida como un modelo de estudio para la relación planta-parásito enumera las ventajas de los tejidos de almacenamiento en dicha investigación, pero bien puede hacerse extensiva a

cuando se utilizan los cortes para otro tipo de investigación. Dichas ventajas son:

- 1.- Disponibilidad de fuente de energía en grandes cantidades; la producción de ATP es derivada de la descomposición de los polisacáridos de reserva.
- 2.- Homogeneidad del tejido celular; la mayoría de las células en tejidos de almacenamiento consiste de células parenquimatosas las cuales son grandes y homogéneas.
- 3.- Fácil aplicación de agentes químicos; en orden a investigar las alteraciones metabólicas a menudo es necesario administrar algún intermediario o compuesto metabólico radiactivo.
- 4.- Almacenamiento a largo plazo de los tejidos vegetales; estos muestran poca actividad fisiológica y/o citológica por tanto tiempo como almacenados a baja temperatura estén, suficiente como para reprimir el brotamiento. Algunos órganos pueden ser guardados frescos tanto como de 7 a 12 meses.
- 5.- Las potenciales actividades fisiológicas y citológicas de los tejidos de almacenamiento; como se ha descrito son muy altas quedando en estado de latencia durante las condiciones de almacenamiento. Cuando son transferidos a temperatura ambiente su actividad no es muy alta. Sin embargo, cuando se hacen los cortes de tales tejidos

sus actividades metabólicas se incrementan marcadamente siendo posible examinar la naturaleza de las alteraciones metabólicas y formación de organelos en relación a los mecanismos de la herida.

- 6.- Un alto contenido de humedad en los tejidos de almacenamiento; esto es muy importante ya que capacita al tejido vegetal para responder al corte muy rápidamente, por lo tanto los homogenados del tejido obtenidos por tratamientos cuidadosos, pueden dar organelos celulares intactos.

1.3. Antecedentes del trabajo.

Después de efectuado el corte, el incremento en la formación de proteínas catalíticas y estructurales, representa la condición más significativa para que exista un cambio en el metabolismo celular, de aquí que por nuestra parte exista especial interés en la respuesta típica durante las primeras horas después de la herida, caracterizada por un aumento en la síntesis de proteínas. Dicho aumento puede ser debido a varias causas posibles:

- a) Activación de genes (desrepresión), dependiente de síntesis específica de ARN y proteínas que se manifiesta en la síntesis de nuevas enzimas que se pueden detectar por la activación de rutas metabólicas específicas (regulación de la expresión del gene a nivel de transcripción y tra-

ducción).

- b) Si vamos a la maquinaria involucrada, la manifestación de síntesis de proteínas aumentada puede ser a nivel de: concentración de ARNm, agregación de polisomas o concentración de factores citoplásmicos, etc., que llevan a unidos como consecuencia la activación de la síntesis de proteínas por respuesta a la herida.

La observación de que un aumento en síntesis de proteínas era uno de los primeros eventos después del corte, se derivó de experimentos llevados a cabo en tejido herido de papa; entre otros órganos de almacenamiento; mediante el uso de sustancias tales como cicloheximida, cloral, puromicina y actinomicina D que inhiben este aumento (17, 18, 19, 20). Asimismo la acumulación de proteína en los cortes de tejido de almacenamiento ha sido demostrada por medio de determinaciones de la cantidad de nitrógeno insoluble en ácido (21, 19, 22) o por incorporación de aminoácidos marcados radiactivamente tanto in vivo (17, 23, 18, 7) como en sistemas aislados de síntesis de proteínas (24, 26, 28, 29).

Chapman y Edelman (24) utilizando un sistema de traducción in vitro de tubérculos de alcachofa Jerusalem (Helianthus tuberosus, L.) mostraron que las preparaciones obtenidas de cortes frescos fueron casi inactivas pero que su actividad

fue aumentando cuando provenian de discos envejecidos, mostrando los de 24 hr una actividad máxima, asimismo que la capacidad sintética de proteínas estaba asociada además de la fracción obtenida de 105 000 x g a una que contenía mitocondrias, sugiriendo que por lo menos hay dos sitios posibles de síntesis, siendo apoyado por los estudios de Sakano y Asahi (25) que mediante experimentos de marcaje in vivo encontraron en tejidos de camote (Ipomoea batatas, L.), que la síntesis de proteínas en las fracciones obtenidas de 100 000 x g y mitocondrial se activan 3 y 1.5 veces respectivamente en respuesta a la herida después de 24 horas.

Ellis y MacDonal (26) utilizando fracciones microsomales aisladas de tejido fresco de betabel (Beta vulgaris, L.) observaron también una muy baja capacidad de incorporación de un aminoácido radiactivo comparada con aquella proveniente de discos envejecidos por uno o dos días, haciendo cruza tanto con sobrenadante celular como con los microsomas llegan a la conclusión de que las aminoacil ARN_t sintetetasas y el nivel de ATP no están limitantes en tejido fresco y por tanto que la baja actividad de síntesis de estas fracciones es atribuible a la fracción microsomal. En apoyo al reporte anteriormente citado, se encuentra otro realizado por Lin et al. (27) mostrando que las diferencias en la incorporación de aminoácidos in vitro entre ribosomas y contenido del sobrenadante celular

de tejido fresco y envejecido de zanahoria (Daucus carota, L.), estuvo confinado principalmente a la fracción del ribosoma. Al realizar las cruas entre esas fracciones y haciendo uso de electroforesis encontraron dos componentes en los ribosomas procedentes de los discos incubados que no están normalmente asociados con los provenientes de tejido fresco, encontrando además que los ribosomas procedentes de tejido envejecido no son completamente dissociables aún a concentraciones de KCl 0.5 M.

En 1967 aparece una publicación de Leaver y Key (28) en donde muestran profundos cambios en los perfiles polisomales de los cortes de tejido de zanahoria, calculando la cantidad de polisomas en tejido fresco se tiene alrededor de un 10% del total de ribosomas extraíbles, sin embargo, después del corte ocurre una rápida agregación de ribosomas de tal manera que después de 6.0 h el 65% de los ribosomas están presentes como polisomas, en este mismo estudio en un sistema de traducción in vitro y en presencia de ARNm endógeno, muestran un aumento en la incorporación del aminoácido radiactivo, en este caso leucina ^{14}C , en relación directa al tiempo de incubación pero cuando al sistema se le suministra un ARNm como lo es el ácido poliuridílico los ribosomas frescos o envejecidos se igualan en cuanto a su capacidad para incorporar fenilalanina ^{14}C ; sugiriéndose que el in-

cremento en la capacidad ribosomal para sintetizar proteínas está relacionado con un adecuado suministro de ARNs mensajeros e independiente del sobrenadante citoplásmico adicional. Estudios realizados por Kahl (29) en papa (Solanum tuberosum, L.) apoyan nuevamente la hipótesis de que el aumento en la síntesis de proteínas se debe a su vez a un aumento en la cantidad de ARNm presente en los tejidos envejecidos, ya que mientras preparaciones de discos de tejido fresco no muestran actividad apreciable en un sistema de incorporación de aminoácidos in vitro, los de tejido incubado o envejecido llevan a un aumento en la incorporación, teniéndose un máximo a las 24 hr y si a los ribosomas de discos frescos se les suministra ácido poliuridílico su actividad de incorporación de fenilalanina incrementa casi 8 veces al igual que cuando adicionan una fracción de ARN aislado de tejido envejecido, concluyendo que los ribosomas de tejido fresco no son inactivos per se sino que les falta uno o varios factores de estimulación, en este trabajo hacen la observación de que los ribosomas provenientes de tejido envejecido son más fácilmente dissociables en sus subunidades que los de tejido fresco, dato contradictorio al descrito por Lin et al. (27).

Sato et. al (30) también asumen que para que comience la síntesis de proteínas en estos cortes, se requiere la síntesis de nuevo ARNm y para analizar esto separan el ARN de los dis

cos de tejido de papa demostrando que la presencia de ácido ribonucleico que contiene poli A en polisomas de tejido envejecido constituye un 70% del total; que la cantidad de ARN polisomal aumenta cinco veces en doce horas y la capacidad traduccional del ácido ribonucleico mensajero asociado a polisomas aumenta en paralelo con el aumento del ARN polisomal.

1.4. Hipótesis y objetivos del trabajo.

Si bien en los reportes anteriormente descritos se ha tratado de estudiar la causa del aumento en la síntesis de proteínas como respuesta a la herida, aun no está claro cuales de los diversos componentes de la maquinaria de síntesis de proteínas se encuentran modificados ya que mientras algunas investigaciones apoyan el hecho de que las fracciones ribosomales no son diferentes sino que es la falta de ARNm u otros factores de estimulación la causa de la activación de la síntesis de proteínas con el corte, otras nos dicen que los ribosomas en si pudieran ser diferentes. Debido a lo anterior, a nosotros nos parece interesante el preguntarse que tan válido es aceptar que la diferencia reside exclusivamente en una u otra fracción ya que los experimentos llevados a cabo en dichos trabajos apuntan hacia una diferencia en ambos, pero que debido a la manera de efectuarse los mismos no se a podido manifestar, esto es: a) al realizar experimentos de traduc

ción in vitro usan sistemas heterólogos (28) por ejemplo, el empleo de sobrenadante celular obtenido de brotes de maíz; b) al hacer comparaciones entre ribosomas de diferente tiempo de envejecimiento, no se trató de ponerlos en igualdad de condiciones, como serían, optimización de sistemas de incorporación in vitro, suministro de ácido ribonucleico mensajero, grado de purificación de las fracciones utilizadas, etc.

Por lo tanto, nuestra hipótesis de trabajo es el proponer que la diferencia en el incremento de síntesis de proteínas, no reside exclusivamente en el ribosoma sino también en el sobrenadante celular que contiene factores, enzimas, etc. que contribuyen al incremento de síntesis de proteínas durante la respuesta de la herida.

Objetivos particulares:

- I.- Establecer el sistema de herida y comprobar varios parámetros que han sido reportados previamente.
- II.- Desarrollar el sistema de incorporación in vivo de aminoácidos marcados radiactivamente.
- III.- Desarrollar un sistema de incorporación in vitro de aminoácidos marcados radiactivamente, de tejidos heridos de papa (Solanum tuberosum, L.) en el que se puedan analizar varios de sus componentes.

2. MATERIALES Y METODOS .

2.1. Reactivos utilizados.

Los reactivos utilizados fueron obtenidos de las siguientes casas comerciales:

Baker: acetato de potasio
 ácido acético
 ácido perclórico
 sacarosa
 sulfato de cobre

Merck: acetato de magnesio
 ácido tricloroacético
 cloruro de potasio
 2-mercaptoetanol
 PPO (2,5 difeniloxazol)
 POPOP (2,2,p-fenilen bis (5-feniloxazol))
 reactivo de Folin-Ciocalteu
 tolueno
 tris (hidroximetilaminometano)

Técnica química:

 carbonato de sodio
 hidróxido de sodio
Sigma: adenosín trifosfato
 aminoácidos

azocaseína
creatina fosfocinasa
ditioetritol
espermina
hepes

Boehringer Mannheim:

Cicloheximida
cloranfenicol
creatina fosfato
guanosín trifosfato

Whatman: Filtros GF/A de 2,5 cm de diámetro

New England Nuclear:

fenilalanina ^{14}C (450 mC/mM)
leucina ^3H (50-60 Ci/mM)
metionina ^3H (5-15 Ci/mM)

2.2. Métodos

2.2.1. Preparación e incubación de los tejidos.

El material vegetal seleccionado fueron tubérculos de papa (Solanum tuberosum, L.) de la variedad "alfa", parte de las cuales fueron compradas en el mercado y otras obtenidas gracias a una donación hecha por el "Programa de la papa" del

CODAGEM, almacenadas a 10°C y transferidos a temperatura ambiente antes de su uso. Los tubérculos fueron lavados superficialmente con agua corriente para desechar vestigios de tierra, posteriormente se les pasó un algodón empapado en hipoclorito de sodio (cloralex) al 10% (v/v) y se volvían a enjuagar.

Bajo condiciones de esterilidad se cortaron los discos de aproximadamente 1-3 mm de espesor por 19 mm de diámetro los cuales fueron lavados con agua esterilizada; los discos denominados de "tejido fresco" fueron utilizados inmediatamente mientras que el resto eran colocados en la cámara de incubación, la cual consistió de una caja de Petri de aproximadamente 9 cm de diámetro con un papel filtro humedecido con 2 ml de agua esterilizada y 50 ug/ml de cloranfenicol para inhibir el crecimiento bacteriano, por último fueron incubados por los tiempos requeridos a \pm 26°C, bajo luz continua.

2.2.2. Aislamiento de ribosomas y preparación de sobrenadante celular.

Los ribosomas fueron extraídos usando el método de Davis et al. (31) con modificaciones menores. De 80 a 100 g de discos de tejido fresco o envejecido por diferentes períodos de tiempo, fueron molidos con 100 ml de buffer de

molienda (0.2 M de sacarosa, 0.2 M tris-ácido acético pH 8.5, 0.06 M KCl, 0.03 M de acetato de magnesio y 0.005 M de 2-mercaptoetanol). El homogenado fue filtrado a través de cuatro capas de gasa sobre un vaso de precipitados previamente enfriado y se centrifugó por veinte minutos a 20 000 xg (rotor J21, Beckman J2 21). El sobrenadante fue colocado sobre un colchón de sacarosa (2 ml de sacarosa 0.5 M y 2 ml de sacarosa 1.0 M en 0.04 M tris-ácido acético pH 8.5, 0.02 M KCl, 0.01 M acetato de magnesio y 0.005 M de 2-mercaptoetanol) y centrifugado por tres horas y media a 100 000 xg (rotor 60 Ti Beckman L5 75).

Al sobrenadante obtenido en el paso de centrifugación anterior le fue determinado el contenido de proteína tanto por el método de Lowry (32) como por espectrofotometría y almacenado a - 70°C hasta su uso, denominándosele S₁₀₀. El paquete ribosomal fue suspendido de acuerdo a su uso posterior en dos soluciones: a) en un ml de buffer A (0.04 M tris pH 8.5, 0.02 M KCl, 0.01 M acetato de magnesio y 0.004 M de 2-mercaptoetanol) o b) un cierto volumen de solución w* (0.002 M tris-ácido acético pH 7.6, 0.02 M KCl, 0.001 M acetato de magnesio y 0.004 M 2-mercaptoetanol), lavando los tubos con otro ml de la solución utilizada.

Los ribosomas suspendidos en w* fueron centrifugados nueva-

mente a 157 000 xg por sesenta minutos (rotor 75 Ti, Beckman L5 75) descartando el sobrenadante y resuspendiendo los paquetes en un ml de w*G (0.002 M tris pH 7.6; 0.02 M KCl, 0.001 M acetato de magnesio, 0.004 M de 2-mercaptoetanol y glicerol 20%) centrifugándose a 9 000 x g 10 minutos (rotor 75 Ti, Beckman L5 75), el sobrenadante fue usado como una preparación de ribosomas denominados "crudos", tomándose la densidad óptica a 260 nm y guardándose en pequeñas alícuotas a - 70°C. Todo fue hecho a 4°C y ninguna de las preparaciones anteriores se usaron cuando tenían más de 15 días de obtenidas.

2.2.3. Perfiles polisomales.

Una muestra de ribosomas suspendidos en buffer A (ver proceso de obtención de ribosomas) conteniendo aproximadamente 0.075 mg de los mismos fue aplicado a un gradiente lineal de sacarosa de 10-48% (en 0.02 M tris-ácido acético pH 8.5, 0.01 M de acetato de magnesio, 0.02 M de KCl, 0.005 M 2-mercaptoetanol) y centrifugado a 32 000 rpm (rotor SW 40, Beckman L5 75) por una hora y media; después de la centrifugación los contenidos de los tubos fueron fraccionados y se determinó absorbancia a cada una de las fracciones a 260 nm.

2.2.4. Tratamiento con precursores radiactivos en tejido intacto.

Para estos experimentos una vez que los discos eran cortados se colocaron en la cámara de incubación 0.5 g de los mismos en presencia de 3 ml de agua estéril y se incubaron por los tiempos requeridos a $\pm 26^{\circ}\text{C}$, pero una hora antes de que se cumpliera este tiempo se agregaron 50 μC de leucina ^3H (60 $\mu\text{C}/\text{mM}$), los discos fueron enjuagados perfectamente con agua destilada y molidos con 8 ml de buffer extractor (0.2 M de sacarosa, 0.2 M tris-ácido acético pH 8.5, 0.06 M KCl, 0.03 M acetato de magnesio y 0.005 M de 2-mercaptoetanol) y se siguió el mismo protocolo que para la obtención de ribosomas. Se calcularon los rendimientos obtenidos en cuanto a contenido de proteína en S_{100} y paquete ribosomal.

De los volúmenes totales obtenidos tanto de S_{100} como de ribosomas, se tomaron 0.2 ml y se agregaron 0.2 ml de ácido tricloroacético al 5%, se colocaron en hielo por 10 minutos, 15 minutos a 90°C y nuevamente 10 minutos en hielo, el material insoluble en ácido fue filtrado a través de filtros de fibra de vidrio GF/A y lavados tres veces con ácido tricloroacético al 5%.

Una vez secos, los filtros se colocaron en un contador de centelleo Tri Carb usando 5 ml de líquido de centelleo (0.269 g POPOP, 4.31 g PPO y 900 ml de tolueno).

2.2.5. Obtención de ribosomas lavados con KCl y lavados ribosomales.

A una muestra de ribosomas "crudos", se les agregó cloruro de potasio 2.0 M a una concentración final de 300 mM, se agitó continuamente por 60 minutos a 4°C y por último se centrifugó a 157 000 x g, 60 minutos (rotor 75 Ti, Beckman L5 75). El paquete ribosomal fue resuspendido en w*G, centrifugando a 9 000 x g (rotor 75 Ti L5 75) por diez minutos y al sobrenadante resultante se le tomó densidad óptica a 260 nm y se almacenó en pequeñas alícuotas a -70°C hasta su uso, denominándoseles ribosomas K₃₀₀. Por otra parte el sobrenadante obtenido en la centrifugación fue dializado contra solución B (0.1 M de acetato de potasio, 0.002 M tris pH 7.6 y 0.004 M de 2-mercaptoetanol), posteriormente liofilizado y por último fue determinado el contenido de proteína por el método de Lowry. A esta última preparación se le denominó lavado ribosomal.

2.2.6. Incorporación in vitro de aminoácidos radiactivos.

Ribosomas "crudos" o K300 fueron utilizados para llevar a cabo experimentos de traducción in vitro adicionandoles todos los componentes necesarios para llevar a cabo la síntesis de proteínas cuantificándose por medio de la incorporación de

un aminoácido radiactivo dentro de la proteína insoluble en ácido tricloroacético; a este sistema lo denominamos reconstituido y sus componentes son los siguientes: 100-120 μg de ribosomas fueron incubados en una mezcla de reacción para síntesis de proteínas(33) modificado y optimizado para el sistema homogéneo de papa, consistiendo de: ditiotreitól 2.5 mM, hepes-KOH pH 7.6 20 mM, ATP 1.0 mM, GTP 20 μM , creatina fosfato 8 mM, creatina cinasa 40 $\mu\text{g/ml}$, acetato de magnesio 2 mM, acetato de potasio 120 mM, cloruro de potasio 120 mM, 19 aminoácidos menos el aminoácido radiactivo, ácido ribonucleico de transferencia de trigo 15 $\mu\text{g/ml}$ y un aminoácido radiactivo que fue en algunas ocasiones metionina - ^3H y en la mayoría leucina - ^3H procurando que la actividad específica (Ci/mM) fuera equivalente. La reacción fue empezada por la adición de 100 - 120 μg de proteína de sobrenadante celular (S_{100}) el cual previamente se dializó contra una solución B (0.1 M de acetato de potasio, 0.001 M tris-acetato pH 7.6 y 0.004 M de 2-mercaptoetanol) por 105 minutos, al término de los cuales fue detenida la reacción por la adición de 0.2 ml de ácido tricloroacético al 16% y otro 5 ml del mismo ácido al 5%, se dejó 10 minutos en hielo y después se calentó a 90°C , 15 minutos, se volvió a enfriar en hielo 10 minutos más y se filtró sobre discos de fibra de vidrio Whatman GF/A de 2.5 cm de diámetro lavándose tres veces con 5 ml de ácido tricloroacético al 5% frío. Una vez secos,

los filtros se colocaron en 5 ml de líquido de centelleo, se determinaron las cpm en un contador de centelleo Packard-tri-carb.

El número de cpm obtenidos en estos experimentos que se presentan en tablas y figuras son resultado de un promedio obtenido de un mínimo de dos a un máximo de cuatro experimentos. En cuanto al número de cpm observados en el sobrenadante celular en ausencia de ribosomas, puede ser debido a una contaminación con monosomas durante el aislamiento de las fracciones constituyentes del sistema de incorporación.

A las soluciones de los paquetes ribosomales obtenidos como se mencionó antes, se les determinó su concentración midiendo a una alícuota llevada a 2 ml con agua, su absorbancia a 260 nm y tomando como blanco una alícuota igual de w*G, considerando que una unidad de densidad óptica en una celda de 1 cm de paso óptico corresponde a una concentración de 20 µg de ARN/ml aproximadamente. Para la determinación de la pureza de las muestras, se determinó a las soluciones su espectro en el rango de 200 a 300 nm en un espectrofotómetro Carl Zeiss.

2.2.8. Determinación de la actividad proteolítica.

El método empleado es el reportado por Miller (34) modificado

en el pH. Al lavado ribosomal dializado, liofilizado y vuelto a dializar, se le determinó el contenido de proteína por Lowry y una concentración equivalente en volumen a 0.46 mg de proteína por ml en el sistema de reacción fue lo que se empleó como fuente de enzima. El sistema contenía azocaseína como sustrato en concentración de saturación (4 mg/ml) en buffer fosfato 56 mM pH 7.6 y ditiotreitól 1 mM. Después de adicionada la fuente de enzima al tiempo cero se tomaba una alícuota de la mezcla de reacción deteniéndose la misma con la adición de ácido perclórico al 14% (v/v) para obtener una concentración final de 7% (v/v) y se mantenía a 4°C. Los tubos para la medición de actividad enzimática se incubaron a 40°C a diferentes períodos de tiempo, al término de los cuales se precipitaban en igual forma que el tiempo cero y se dejaban en hielo durante una hora. Después de este tiempo, todos los tubos se centrifugaron 3 500 rpm por diez minutos en una centrifuga clínica; cada sobrenadante se colectó por decantación y se le midió inmediatamente el aumento en absorbanza a 340 nm en celdas de cuarzo de 1 cm de espesor en un espectrofotómetro Carl Zeiss. La actividad específica medida se definió como el cambio en 0.001 D.O. a 340 nm por hora por mg de proteína.

Cuando se llevaron a cabo experimentos con el inhibidor de proteasa fluoruro de fenil metil sulfonilo (PMSF), el proce

dimiento a seguir fue el ya citado previa una incubación del inhibidor con la fuente de enzima, por espacio de 30 minutos a 30°C (35).

3. RESULTADOS

3.1. Establecimiento del sistema de herida.

Para poder iniciar el estudio de la maquinaria de síntesis de proteínas durante la respuesta a la herida, fue necesario el establecer que tanto la edad del tubérculo como el sistema utilizado para la incubación de los cortes de tejido eran adecuados en cuanto a que se podían reproducir parámetros que de acuerdo a la literatura son característicos de este fenómeno. Aunque los datos no son presentados se llegó a concluir que aquellos que tienen un diámetro aproximado de 7 cm, que de acuerdo con lo reportado por Weilgat et al. (36) son aquellos que se encuentran en estado latente, fueron los que dan una respuesta significativa a la herida. En cuanto a que nuestro sistema de incubación funcionaba quedó demostrado de acuerdo a los resultados mostrados en las primeras cuatro figuras, en donde se puede apreciar primeramente el incremento en el contenido ribosomal, esto es el sedimento obtenido de $100\ 000 \times g$ durante los diferentes períodos de incubación del tejido y bajo las condiciones del sistema ya indicados en la metodología (fig. 1). El mayor aumento de contenido ribosomal fue observado alrededor de las 8.0 h en donde se nota un 202% de incremento sobre el control (tejido fresco), manteniéndose constante por las si

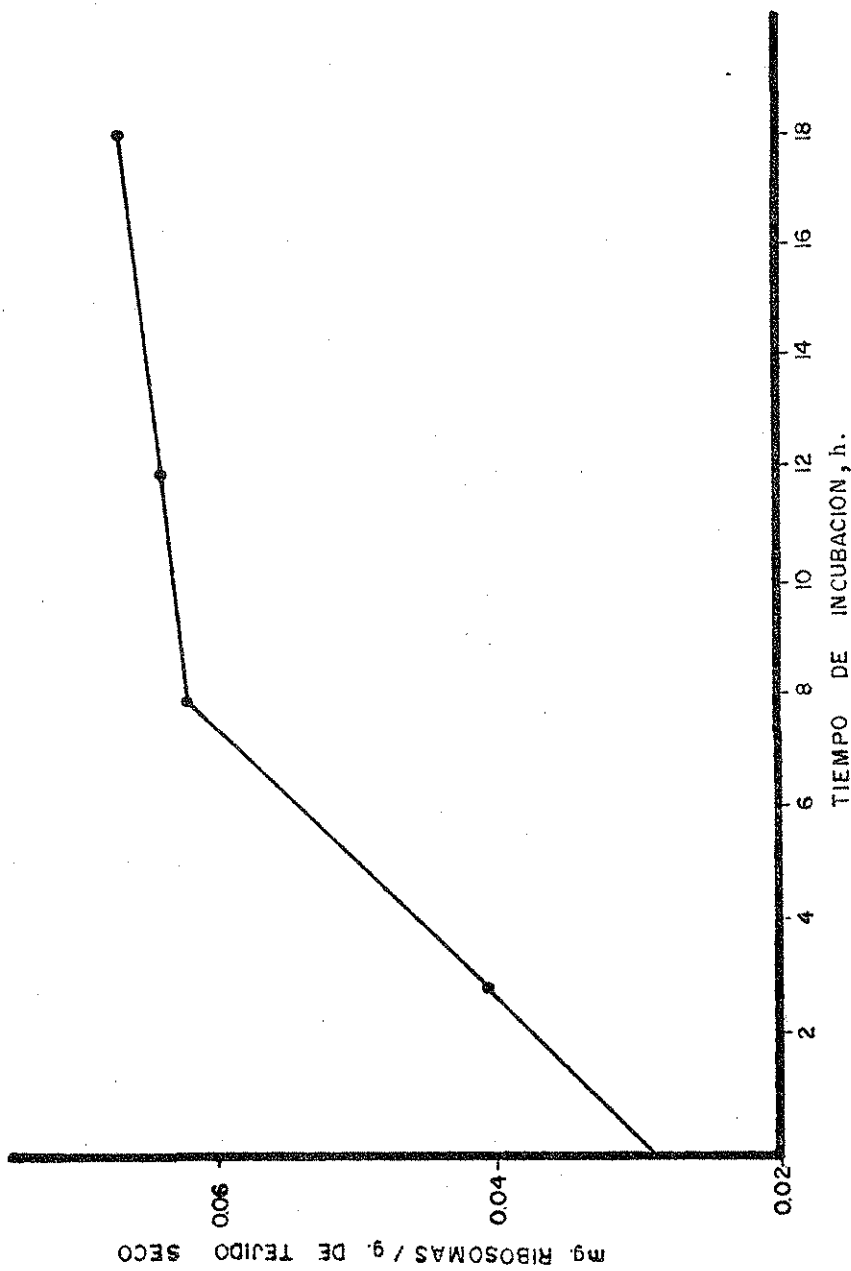


Fig. 1. Determinación del contenido ribosomal en cortes de papa durante la respuesta a la herida. Los discos fueron envejecidos en un volumen estándar de agua destilada a 20°C y los ribosomas se aislaron y cuantificaron como se describe en "materiales y métodos".

guientes 10 h. Concomitantemente con este aumento en el contenido ribosomal se demostró un aumento en el contenido de proteína total, tanto por el método de Lowry (fig. 2) en donde se tiene un máximo en un punto cercano a las 6.0 h de incubación así como por medio de la incorporación in vivo (fig. 3) de un aminoácido marcado radiactivamente (en este caso leucina ^3H) a una proteína insoluble en ácido tricloroacético, determinado en el sobrenadante de 100 000 xg en donde podemos encontrar el máximo de incorporación alrededor de las 18.0 h, hecho que coincide con una disminución de la poza de aminoácidos según lo encontrado por Pérez (37) y lo que nos estaría indicando un máximo de actividad de síntesis de proteínas alrededor de estas horas. En este mismo experimento de incorporación in vivo se probaron dos actividades específicas diferentes de leucina tritiada con el fin de poder descartar el que la radiactividad estuviera limitante y que la caída de incorporación observada después de las 18.0 h fuera debido a una limitación de marca, encontrándose que no era así, asimismo se determinó la cantidad de radiactividad asociada al paquete ribosomal coincidiendo con la tendencia encontrada en proteína total (fig. 4).

Por otra parte, como ya se mencionó anteriormente, uno de los cambios más claramente observados por Leaver y Key en cortes de tejido de zanahoria (28) durante las primeras ho-

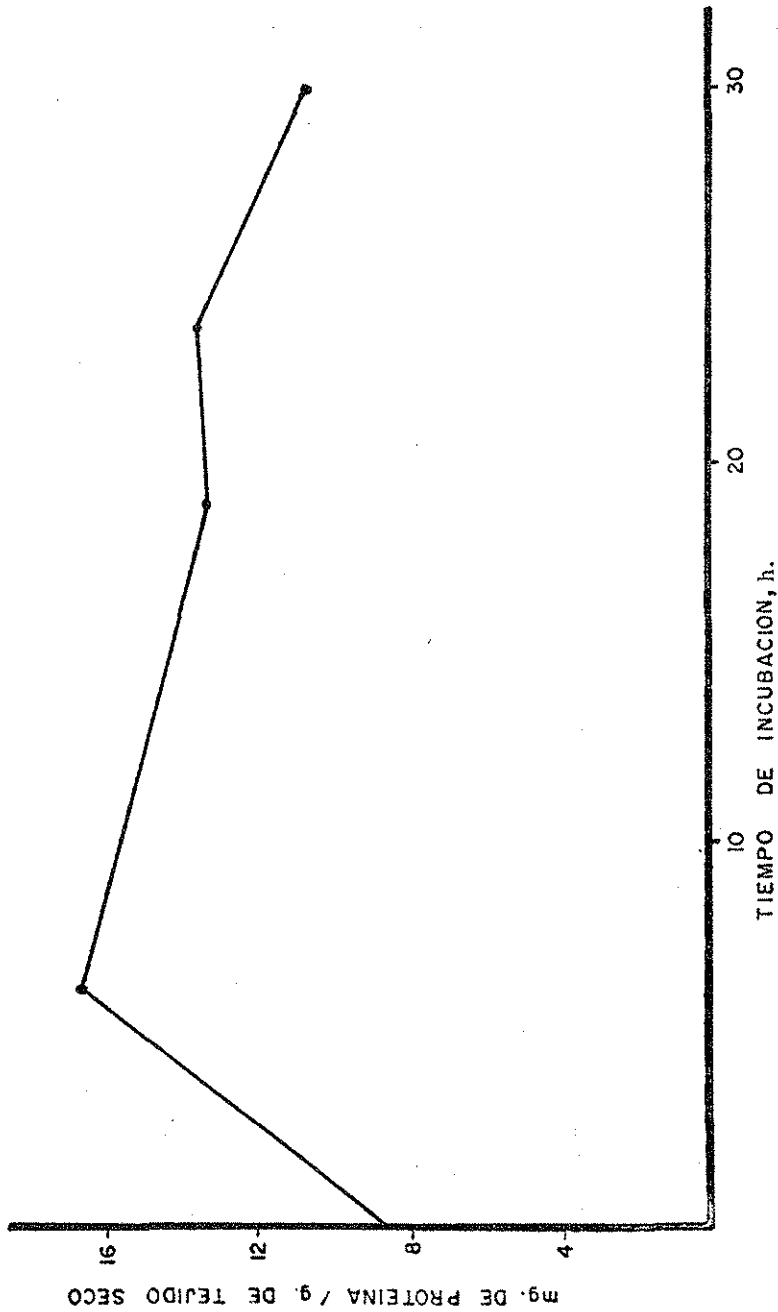


Fig. 2. De terminación del contenido de proteína total en el sobrenadante de 3500 X g como respuesta a la herida en tejido de tubérculos de papa. Las proteínas se determinaron por el método de Lowry (32).

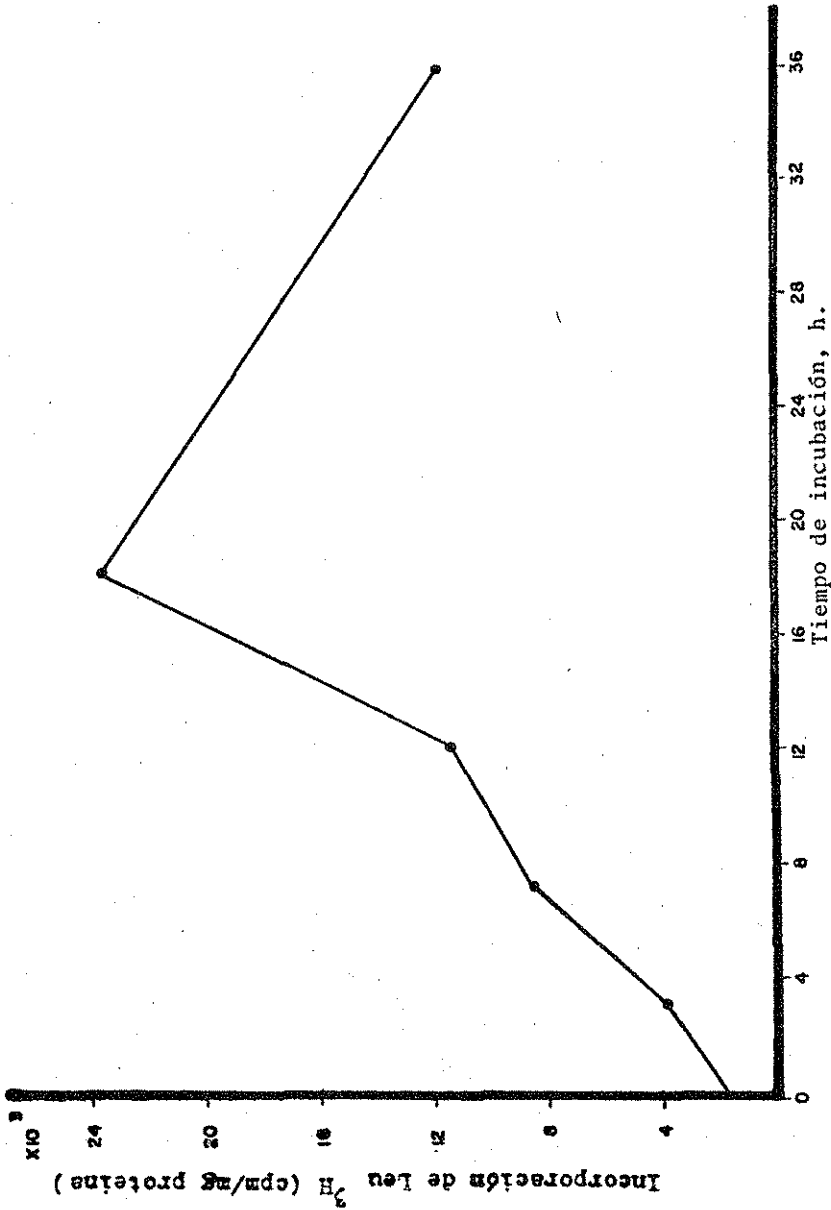


Fig. 3. Incorporación in vivo de leucina ³H a la protefina del sobrenadante celular (100 000 x g) en diferentes períodos de envejecimiento. Los cortes de tejido de papa fueron incubados a los tiempos que se indican. La leucina se agregó una hora antes de que se compliera el tiempo de incubación.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

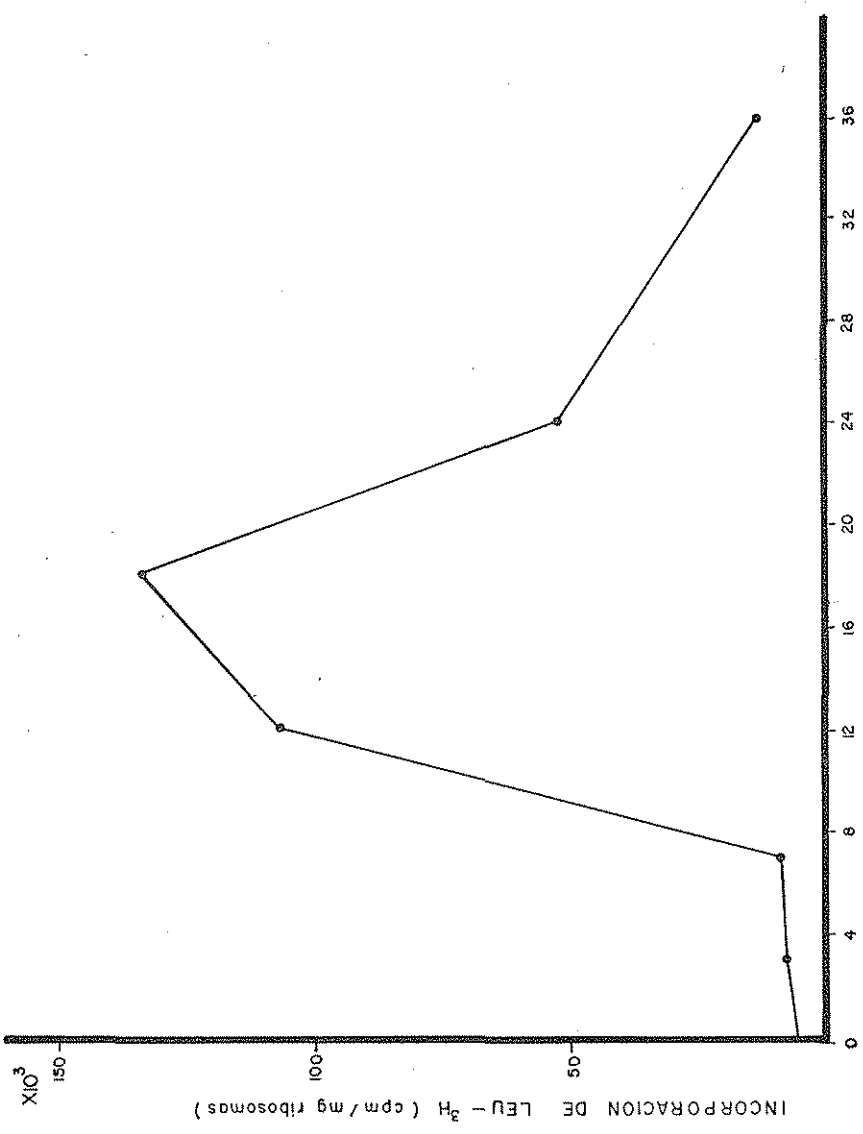


Fig. 4. Determinación de la incorporación in vivo de leucina ³H en ribosomas aislados a distintos tiempos de incubación. La leucina se adicionó 1 hora antes del término de la incubación con excepción del tiempo 0 h en el cual se adicionó por 20 minutos. Se aisló la pastilla ribosomal por centrifugación y se determinó el material radiactivo insoluble en ácido acético.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

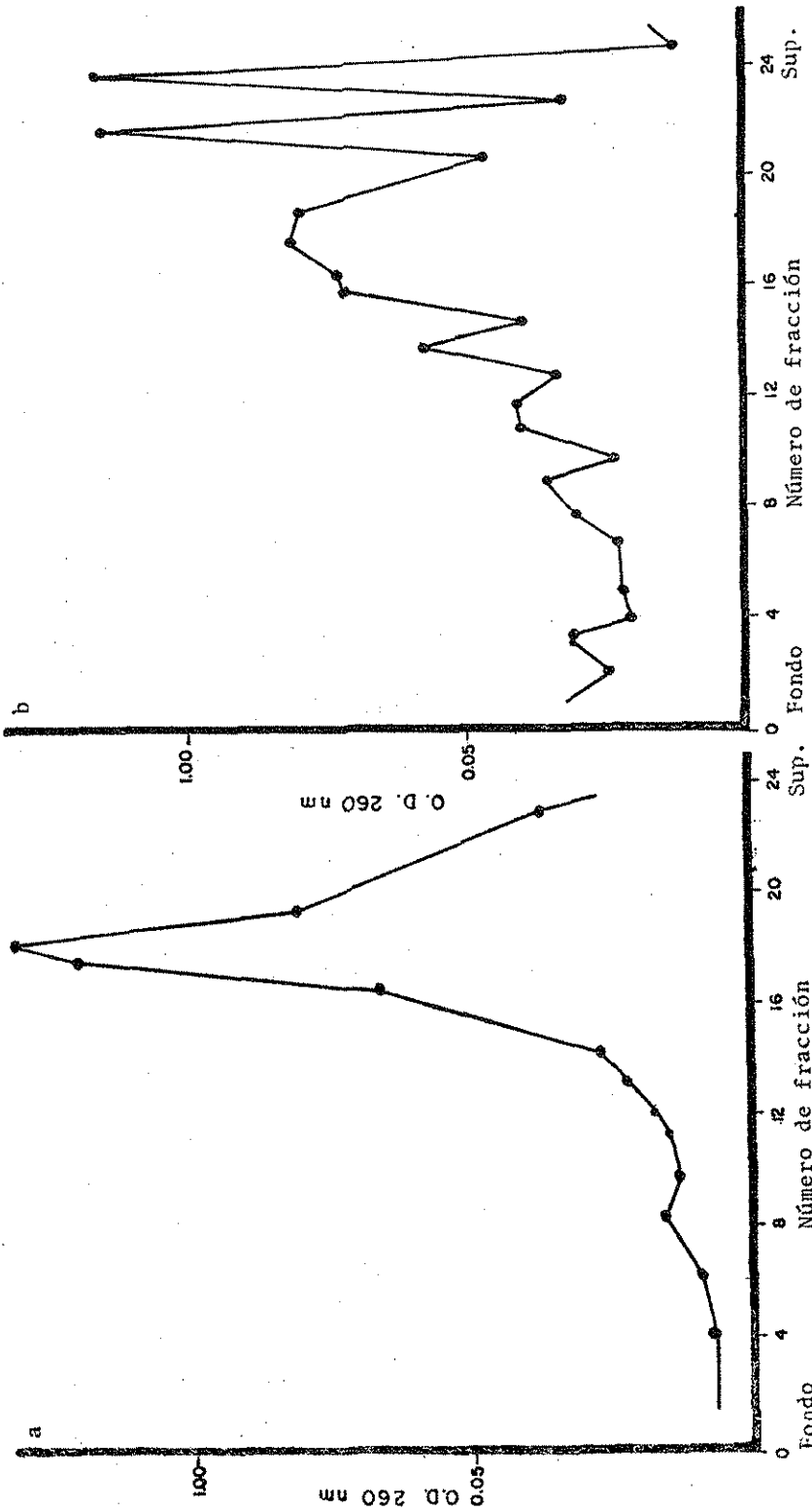


Fig. 5. Distribución en gradientes de sacarosa (10-48% P/V) de ribosomas aislados de tejido de tubérculos de papa. a) Tejido fresco, b) tejidos envejecidos por 18 h en agua esterilizada a 26°C. En cada gradiente se colocaron aproximadamente 0.75 mg de ribosomas.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

ras de la respuesta a la herida es la transición de monoribosomas en tejido fresco a polisomas en tejido herido, hecho que se muestra en la figura 5 en donde se puede comprobar la distribución de ribosomas aislados de ambos tejidos y que concuerda con lo anteriormente citado.

Con la reproducción de estos parámetros se dió por establecido el poder manejar un sistema de incubación que responda en sus cambios bioquímicos a los esperados para la respuesta de herida, por lo que se procedió al establecimiento del siguiente objetivo.

3.2. Optimización del sistema de incorporación in vitro de aminoácidos marcados.

Para llevar a cabo nuestra investigación, requerimos de un sistema de incorporación in vitro de aminoácidos marcados radiactivamente que fuera homogéneo, para esto procedimos a establecerlo y tal y como está en la literatura se encontró que a mayor tiempo de envejecimiento los sistemas reconstituidos con ribosomas "crudos", es decir los que obteníamos de la primera centrifugación, daban mayor incorporación del aminoácido radiactivo, sin embargo el número de cuentas por minuto que se obtenían era muy baja sobre todo para ribosomas frescos, por lo que tratando de optimizar este sistema

se procedió a tratar a tales ribosomas "crudos" con cloruro de potasio adicional a una concentración final de 300 mM y a los ribosomas obtenidos después de este paso los denominamos K_{300} ; nuevamente se compararon las actividades de síntesis de proteínas de fracciones reconstituídas obtenidas de diferentes períodos de incubación. Se encontró nuevamente que había una mayor incorporación de leucina en preparaciones procedentes de tiempo 8.0 h de incubación que de tejido fresco, pero que el número de cuentas por minuto habían aumentado 14 veces con respecto a los ribosomas crudos para tejido fresco, 2.6 veces para tejido de 8.0 h y 5 veces para tejido de 18 h y estos resultados se pueden observar en la tabla 1. Cuando los ribosomas eran tratados con una concentración aun mayor de cloruro de potasio se encontró una inactivación total ya que no se observa incorporación alguna para sistemas de tejido fresco y 8.0 h de incubación, lo que nos indica lo drástico del tratamiento debido a la eliminación de algun(os) factor(es) necesario(s) para llevar a cabo la síntesis de proteínas; el sistema de 18.0 h también pierde actividad pero sólo en un 60%. No obstante, con el lavado del cloruro de potasio a una concentración final de 300 mM logramos eliminar algo asociado a ribosomas que impedía una buena incorporación en los sistemas reconstituídos. A partir de este momento se utilizaron ribosomas K_{300} y se procedió a la optimización del sistema de incorporación in vitro de

Tabla 1. Estimulación de la incorporación de Leu -³H in vitro en sistemas reconstituidos aislados de tejido fresco y herido de Solanum tuberosum, L. Se muestran los resultados utilizando ribosomas lavados con tres concentraciones diferentes de sal para su purificación: ribosomas crudos (20 mM de KCl), ribosomas K₃₀₀ (300 mM de KCl), ribosomas K₅₀₀ (500 mM de KCl). Las cpm corresponden a un sistema de traducción en volumen final de 100 ul y 120 ug de proteína de sobrenadante celular.

Tiempo de incubación (hrs)	Ribosomas crudos (cpm/.12 mg)	Ribosomas K ₃₀₀ (cpm/.12 mg)	Ribosomas K ₅₀₀ (cpm/.12 mg)
0.0	178	2472	0
8.0	1575	4110	0
18.0	4475	20109	8020

acuerdo a los siguientes parámetros: concentración de protefina en sobrenadante celular de 100 000 x g, de ribosomas, tiempo y temperatura de incubación (fig. 6); asimismo se optimizó la concentración de acetato de magnesio, acetato de potasio y espermina (fig. 7), siendo interesante el observar que cuando el sistema es suministrado con espermina, el nivel de magnesio requerido baja de 8 a 2 mM para obtener un máximo de incorporación. En la tabla 2 se presentan las concentraciones óptimas finales de cada uno de los componentes del sistema de incorporación utilizando tejido fresco y que es el que utilizamos para los demás experimentos, extrapolarando estas condiciones también para el sistema de tejidos envejecidos.

Finalmente en la tabla 3 se presenta el rendimiento final obtenido por el tratamiento con sal de cloruro de potasio en la incorporación del sistema reconstituido de tejido fresco y envejecido y la estimulación obtenida después de la optimización del sistema, pudiéndose observar que fue notablemente aumentada con respecto a las preparaciones crudas.

3.3. Comparación de las actividades ribosomales K_{300} y componentes del sobrenadante celular obtenido de 100 000 x g (S_{100}).

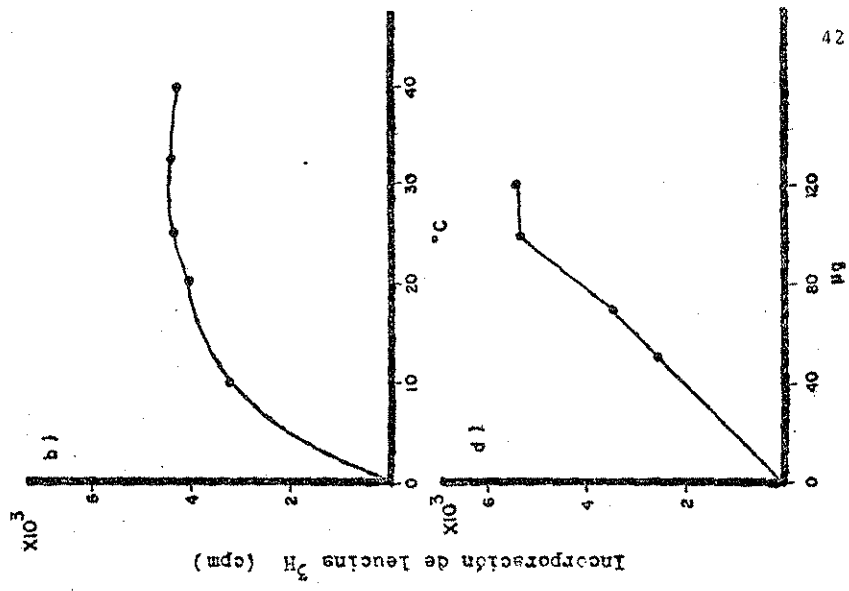
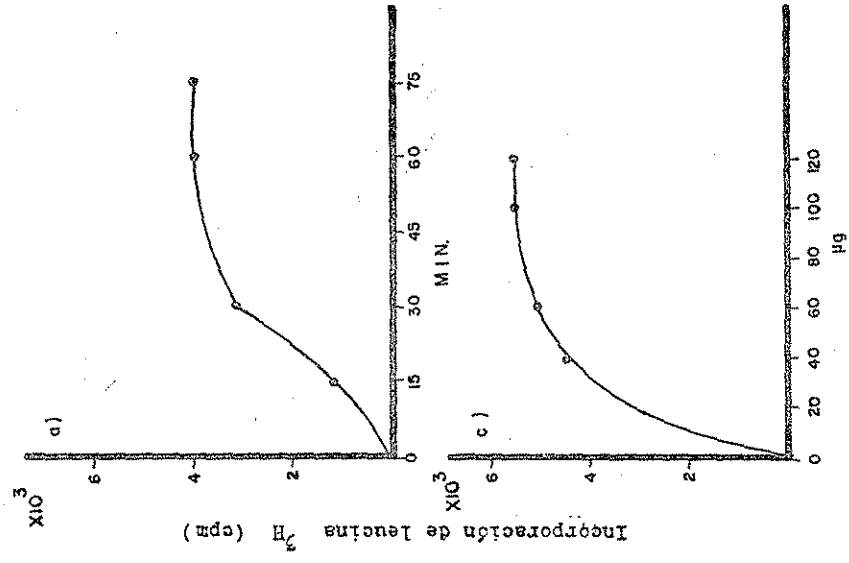


Fig. 6. Optimización del sistema de traducción in vitro de papa. Los parámetros optimizados fueron los siguientes: a) tiempo, b) temperatura, c) concentración de ribosomas y d) concentración de sobrenadante celular (por contenido de proteína). Ribosomas aislados de tejido fresco fueron incubados 1 h a 30°C con una mezcla de reacción para síntesis de proteínas para dirigir la incorporación de leu ^{-3}H .

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

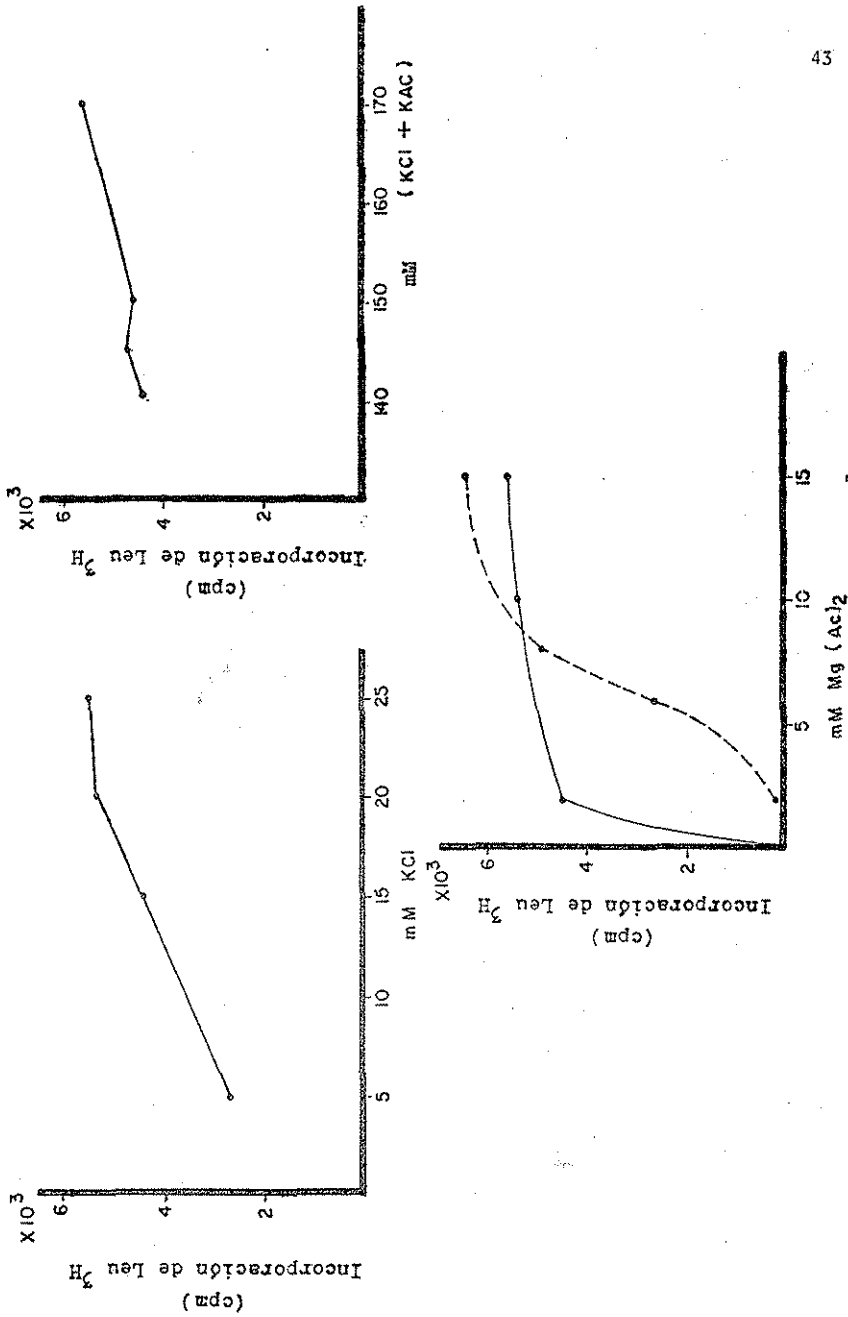


Fig. 7. Optimización del sistema de incorporación in vitro de Leu - ^3H en tejido fresco de papa. a) concentración de cloruro de potasio, b) concentración de acetato de potasio y c) concentración de acetato de magnesio. — con espermina a una concentración de 30 μM , --- en ausencia de espermina. El procedimiento seguido fue igual que el descrito en la figura 6.

Tabla 2. Concentraciones óptimas de los componentes del sistema de traducción in vitro en el sistema reconstituido homogéneo de papa. La mezcla tenía cada uno de estos componentes menos el que se estaba optimizando, en un volúmen final de 100 μ l, incubado a 30°C por 60 minutos y finalmente la reacción era detenida mediante la adición de ácido tricloroacético.

Hepes-KOH pH 7.6	20 mM
ATP	1 mM
GTP	20 μ M
Creatina fosfato	8 mM
Creatina cinasa	40 μ g/ml
Acetato de magnesio	2 mM
Acetato de potasio	120 mM
Ditiotreitol	2.5 mM
Espermina	80 μ M
Cloruro de potasio	20 mM
19 aa (-leucina)	30 mM
ARN _t de germen de trigo	15 μ g/ml
Sobrenadante celular	120 μ g
Ribosomas	120 μ g
Leucina - ³ H	1 μ C

Tabla 3. Estimulación obtenida en el sistema de incorporación de leucina ^3H in vitro después de la optimización del mismo. Las condiciones de la medición son citadas en "materiales y métodos".

Tiempo (hr)	Ribosomas μg	Sobrenadante μg	Purificación	cpm ^3H Leu.	Incremento
0	120	120	Rib. crudos	178	1
0	120	120	Rib. K300	4008	22.5
18	120	120	Rib. K300	22845	128.3
18	120	120	Rib. crudos	4475	25.2

El siguiente objetivo de nuestra investigación era el de mostrar que la diferencia en actividad para la incorporación, en este caso leucina tritiada, de las preparaciones procedentes de diferentes períodos de incubación, se encuentra no sólo a nivel de ribosomas sino también del contenido del S_{100} . Para ello se seleccionaron tres tiempos de incubación: 0.0, 7.0 y 18.0 h que de acuerdo a los experimentos de incorporación in vivo presentan buena actividad de síntesis de proteínas. Si lo que se plantea era lo correcto, entonces se esperaba que tanto paquete ribosomal como S_{100} mejoraran con el tiempo de incubación y por lo tanto si se realizaban cruza entre ambos se debía poner de manifiesto este hecho. En la figura 8 se presentan los resultados obtenidos en la titulación de S_{100} de diferentes tejidos incubados. En este caso se trabajó con ribosomas aislados de tejido fresco, manteniéndolos a una concentración constante final de 120 μg y variando las concentraciones de S_{100} con respecto al contenido de proteína total, en este caso fueron tres las concentraciones usadas: 40, 60 y 100 μg por sistema, observándose que en cualquiera de los tres casos es el sobrenadante procedente de tejidos incubados por 7.0 h el que estimulaba más la incorporación (de 2 500 cpm a 13 500 cpm) siguiendo el de 18.0 h (de 1 100 cpm a 11 500 cpm) y no su propio sobrenadante, lo que indica una diferencia para estimular la incorporación del aminoácido radiactivo a nivel de los componentes del sobrenadante celular.

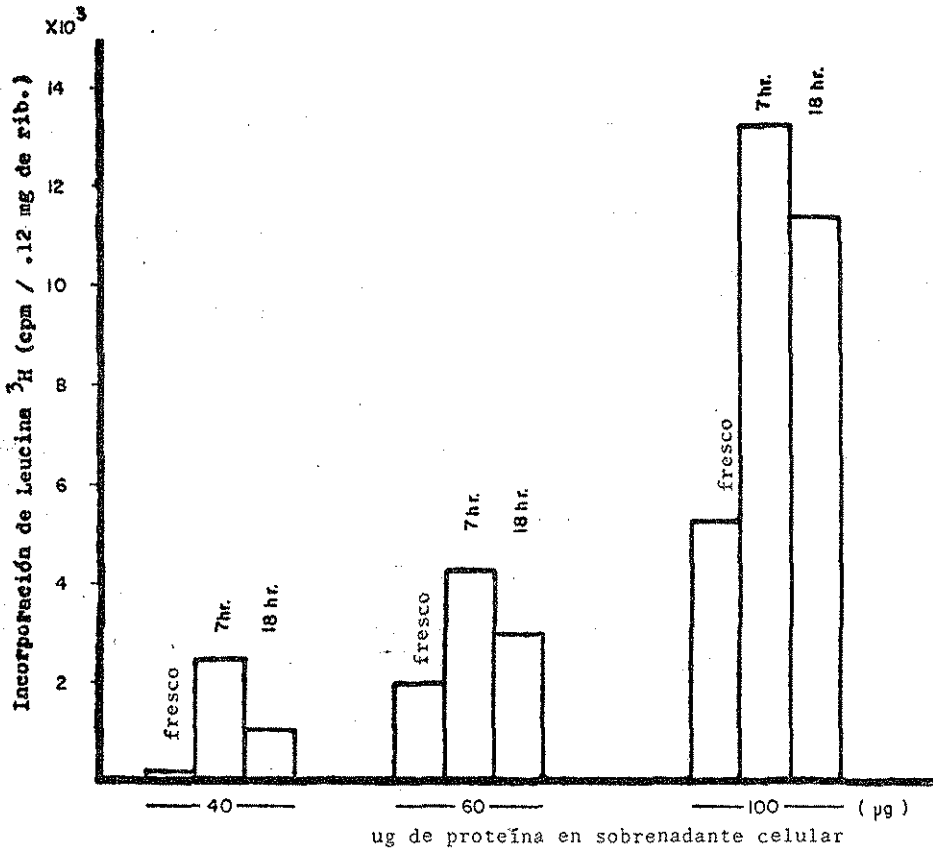


Fig. 8. Incorporación in vitro de leucina ^3H por ribosomas de tejido fresco de papa en presencia de sobrenadante celular obtenido de tejido fresco, de 7.0 h y de 18.0 h de incubación.

Debido al difícil manejo del tiempo 7.0 h ya que la extracción y lavado debe hacerse el mismo día, optamos por trabajar sólo con tejidos fresco y envejecido por 18.0 h y los resultados presentados de aquí en adelante serán sólo a estos tiempos.

Como contraparte de los resultados presentados en la figura 8, en la figura 9 se muestran datos obtenidos de las cruces entre sobrenadante celular y ribosomas aislados de tejido fresco y de 18.0 h de incubación. En este experimento tanto la concentración del sobrenadante celular como la de los ribosomas de ambas fracciones (tejido fresco y de 18.0 h de incubación) se mantuvo constante. Se puede observar una mayor estimulación de la incorporación de Leu ^3H cuando el sobrenadante celular aislado de tejido fresco se encuentra en presencia de ribosomas procedentes de tejido envejecido por 18.0 h (c) que en la de ribosomas de tejido fresco (b); en caso de suministrar sobrenadante celular de tejido envejecido el sistema homogéneo (e) es el más eficiente de todos y si se sustituye su fracción ribosomal por la obtenida de tejido fresco (d) la incorporación es menor, lo que nos muestra una diferencia en cuanto a la contribución del ribosoma presente que se manifiesta en el rendimiento de incorporación de Leu ^3H siendo mayor en el caso de ribosomas aislados de tejido envejecido, además se confirma nuevamente que también

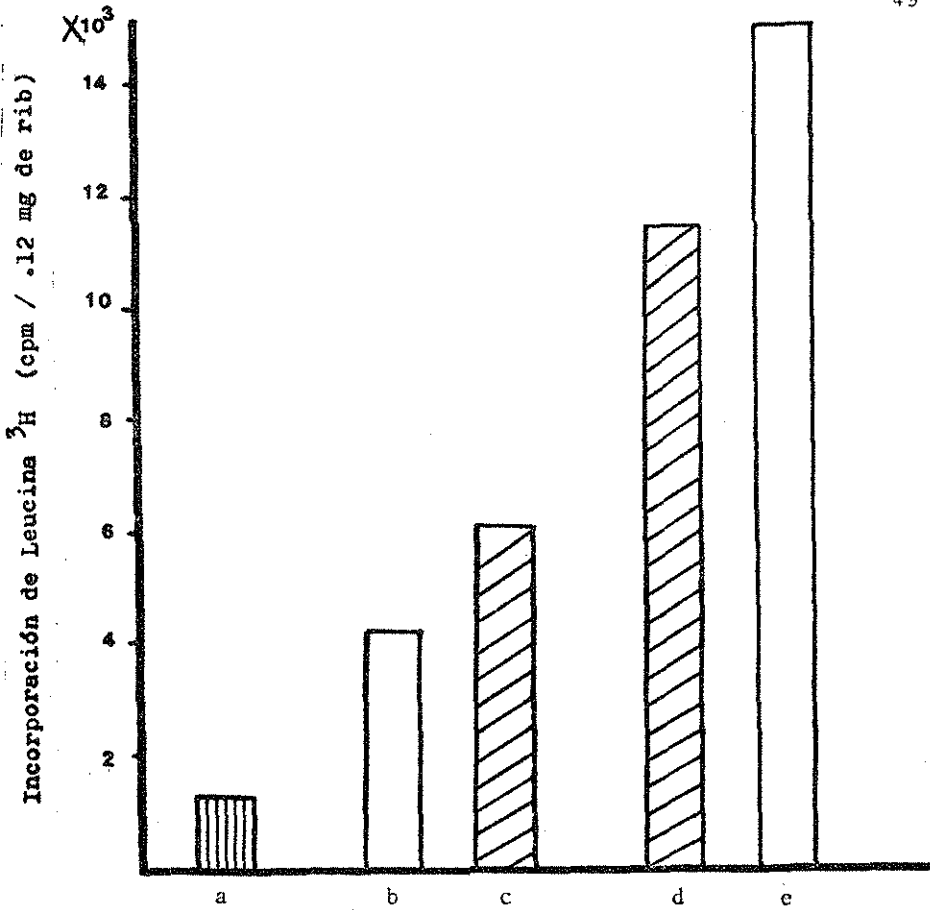


Fig. 9. Actividad diferencial de la incorporación de leucina ^3H en sistemas de traducción in vitro de tejido fresco de papa y tejido incubado 18.0 h.

- a) Sobrenadante celular fresco (St_0) ó incubado (St_{18}) en ausencia de ribosomas.
- b) Sistema homogéneo t_0 (Rib. tej. fresco + Sobr. tej. fresco).
- c) Sistema cruzado (Rib. tej. 18.0 h + Sobr. tej. fresco)
- d) Sistema cruzado (Rib. tej. fresco + Sobr. tej. 18 h)
- e) Sistema homogéneo t_{18} (Rib. tej. 18.0 h + Sobr. tej. 18 h).

el sobrenadante de tejido envejecido es más eficiente.

Asimismo en la tabla 4 experimentos llevados a cabo con metionina tritiada corroboran nuevamente el hecho de que las fracciones ribosomales y citoplásmicas muestran diferencias, ya que al realizar las cruces entre ribosomas y sobrenadante celular (una concentración fija de 120 ug en ambos componente) la observación final igual que en el experimento con leucina tritiada es que con el tiempo de envejecimiento la fracción ribosomal mejora en cuanto a su capacidad de incorporación de un aminoácido radiactivo aún en presencia de un sobrenadante celular poco eficiente como lo es el obtenido de tejido fresco.

Hasta aquí podemos concluir que nuestro primer objetivo queda demostrado en cuanto a que la diferencia en actividades de síntesis de proteínas durante las primeras horas de la respuesta de herida, al menos in vitro, queda confinada tanto a la fracción ribosomal como a los componentes del sobrenadante celular.

3.4. Efecto de la adición del lavado ribosomal K_{300} sobre los sistemas de incorporación in vitro.

Dado que el tratamiento de los ribosomas con cloruro de pota-

Tabla 4. Incorporación de leucina y metionina ^3H in vitro por sistemas reconstituídos homogéneos y cruzados, de ribosomas aislados de discos frescos y envejecidos de papa. La mezcla de reacción contiene 120 μg de ribosomas, 120 μg de proteína del sobrenadante celular. Otras condiciones de la reacción en "materiales y métodos".

	Leu- ^3H		Met- ^3H	
	cpm	estimulación	cpm	estimulación
St ₀	1216	1.0	1333	1.0
St ₀ + Rib t ₀	4148	3.4	1823	1.4
St ₁₈ + Rib t ₀	11350	9.3	2823	2.1
St ₁₈	820	1.0	1172	1.0
St ₁₈ ^t + Rib t ₁₈	14933	18.2	3975	3.4
St ₁₈ ^t + Rib t ₀	6437	7.8	4628	4.0

sio a una concentración final de 300 mM nos dió una estimulación en la incorporación de leucina radiactiva, observada como un aumento en las cuentas por minuto obtenidas en los sistemas reconstituídos, nos pareció interesante corroborar el efecto inhibitorio de los lavados ribosomales sobre sus propias fracciones procedentes y tratar de conocer algunas de sus propiedades. Al sobrenadante obtenido de ribosomas de tejido fresco por este tratamiento lo denominamos lavado ribosomal de tiempo cero (L. R. t_0) o L.R. t_{18} si proviene de ribosomas de tejido envejecido por 18.0 hr.

Con el fin de medir el efecto del lavado ribosomal, era necesario su previa concentración y por consiguiente su diálisis posterior. Si la fracción permanecía siendo inhibitoria, en primer lugar nos indicaría que el factor(es) inhibitor(es) sería(n) de peso molecular considerable por ser no dializable y efectivamente esto fue lo encontrado.

En la figura 10 podemos observar el efecto inhibitorio de los lavados ribosomales sobre sus propios sistemas reconstituídos, siendo más marcado este efecto en el lavado procedente de tiempo 0.0 h que en el de tejido envejecido. Asimismo para saber un poco acerca de la naturaleza del(los) compuesto(s) inhibitorio(s) del lavado ribosomal, estos se calentaron por

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

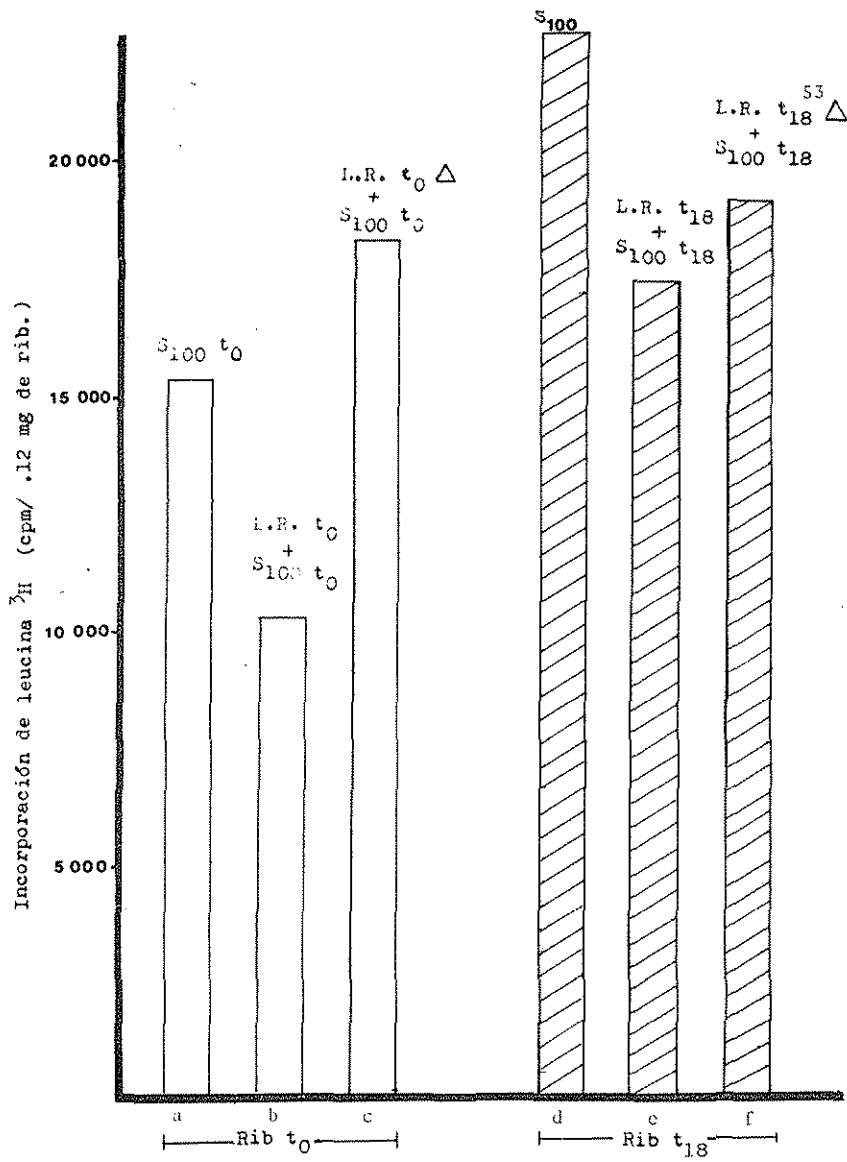
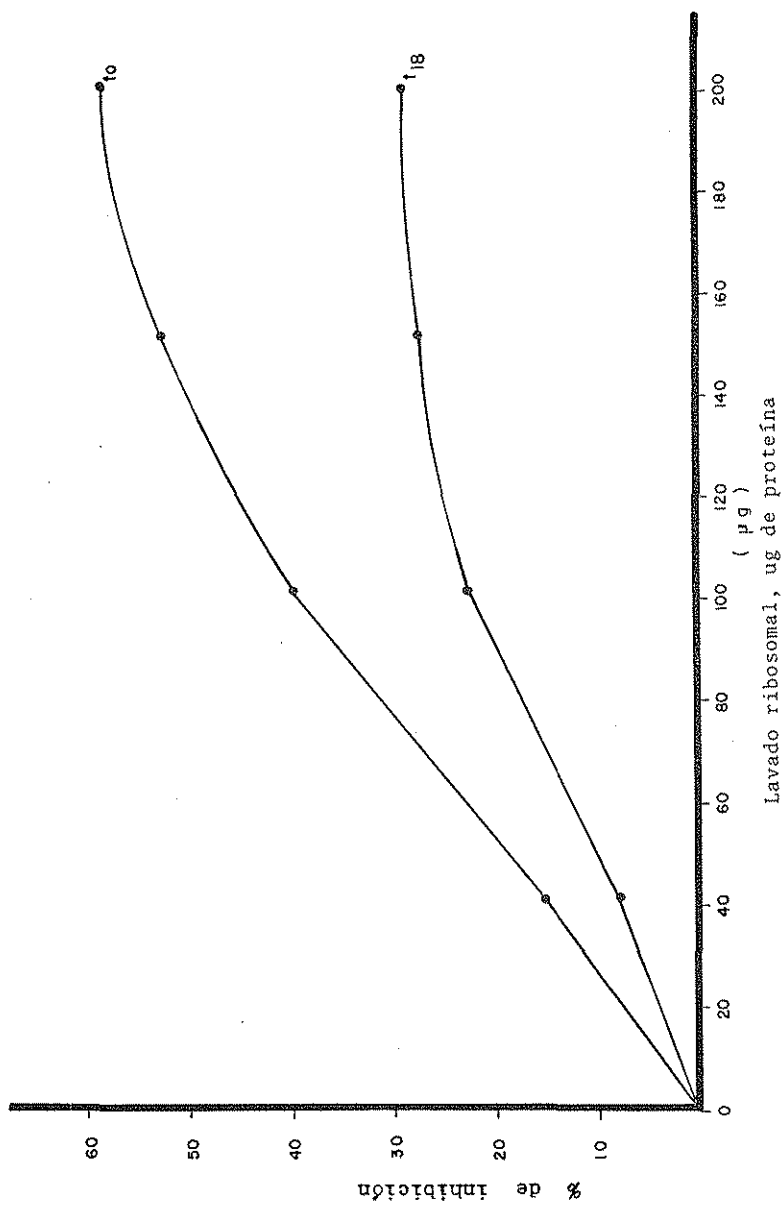


Fig. 10. Inhibición de síntesis de proteínas por la adición de lavado ribosomal. Se midió la incorporación de leucina tritiada *in vitro* en la fracción insoluble en ácido tricloroacético en presencia del lavado ribosomal, 10⁶ u_g de prot., 8500 dializado (L.R.), tanto calentado a ebullición (Δ) como sin llevar a cabo este tratamiento.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5 minutos a 90°C y se adicionaron nuevamente a los sistemas completos de incorporación de leucina radiactiva y como se observa hubo reversión de la inhibición (c vs b y f vs e). La figura 11 nos representa comparativamente el porcentaje de inhibición causada por los lavados ribosomales en sus propios sistemas, encontrándose alrededor de un 55% para tiempo 0.0 h y 28% para tiempo 18.0 h a una concentración de 200 μ g de proteína de lavado ribosomal; en la figura 12 podemos observar que ese efecto inhibitorio se pierde con el tiempo de almacenamiento a - 70°C, motivo por el cual las determinaciones con lavado ribosomal se hacían inmediatamente después de obtener las fracciones liofilizadas y dializadas.

En la figura 13 se muestra la incorporación obtenida en presencia y ausencia del lavado ribosomal. Podemos observar en primer lugar, lo ya establecido, que sistemas completos (es decir fracciones ribosomales con sus propios S₁₀₀) de tiempo 0.0 h son menos eficientes (barras blancas) para incorporar leucina radiactiva que los provenientes de 18.0 h (barras rayadas). Cuando a cada uno de estos sistemas se les adicionaba su propio L.R. a una concentración de 100 μ g por contenido de proteína determinada por Lowry, la actividad de síntesis de proteínas se baja alrededor de un 40% en el sistema de tiempo 0.0 h (a vs b) y un 10% en el de tiempo 18.0 h (a' vs b') lo que nos indicaba una capacidad de inhibición di



Lavado ribosomal, ug de proteína

Fig. 11. Inhibición de síntesis de proteínas in vitro de sistemas homogéneos de papa por la adición de su propio lavado ribosomal. Sistemas reconstituidos de: tejido fresco o de tejido incubado en presencia de lavado ribosomal concentrado y dializado previamente.

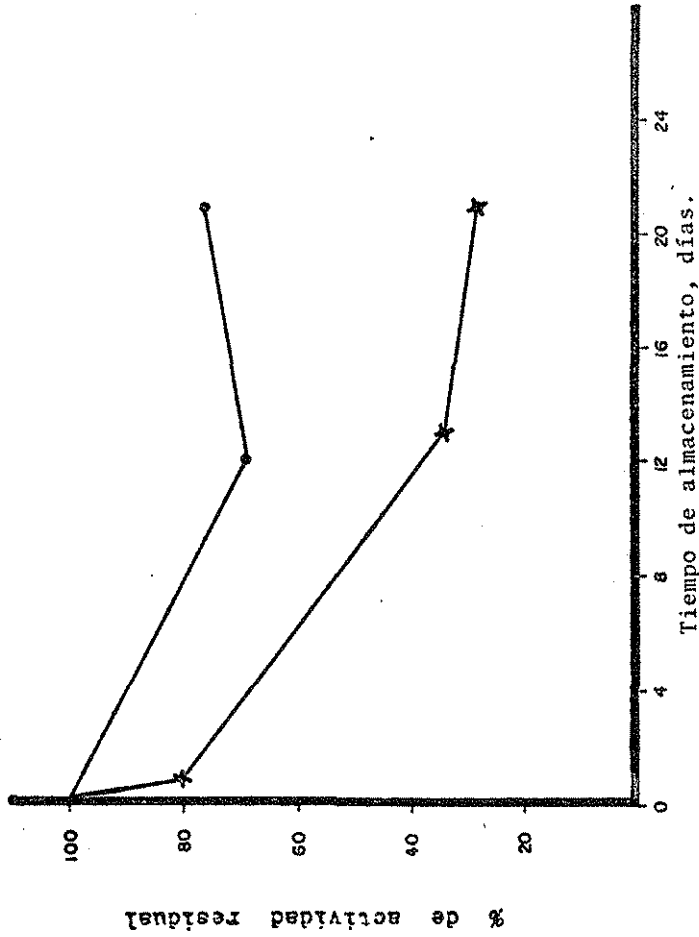


Fig. 12. Pérdida de la actividad inhibitoria del lavado ribosomal, por almacenamiento a -70°C. Fracciones reconstituídas de tejido fresco de papa (X) y tejido incubado 18.0 h (O) fueron medidos con su mismo lavado ribosomal respectivamente a los días indicados.

ferencial en los lavados ribosomales, al realizar una cruzade lavados ribosomales en presencia de sistemas completos, queda claro que el lavado ribosomal procedente de tejido fresco es más inhibitorio que el de tiempo 18.0 h (como ya se había apuntado anteriormente) al ser adicionado al sistema completo de tiempo 18.0 h (b'vs c') ya que nos da una inhibición más acentuada (4 veces) que cuando se usa su propio lavado ribosomal. Por el contrario cuando al sistema completo de tiempo 0.0 h se le suministra L.R. t_{18} se obtiene casi el mismo por ciento de inhibición que cuando se usa su propio lavado (b vs c), pensamos que esta capacidad inhibitoria diferencial de los lavados ribosomales no se observa debido posiblemente a la baja eficiencia del sistema homogéneo de tejido fresco reconfirmándose así la diferencia existente en los componentes del S_{100} , ya que por otra parte cuando hacemos doble cruzade entre lavados ribosomales y S_{100} vemos que el sistema cruzado en presencia de ribosomas de tiempo 18 con sobrenadante y lavado ribosomal de tiempo 0 h el efecto inhibitorio es mayor que cuando comparamos el sistema completo del tiempo 18 h, más su propio lavado ribosomal (d'vs b'), lo que nos indica que posiblemente aparte de la inhibición por el lavado ribosomal, el sobrenadante celular de tejido fresco es menos eficiente en la síntesis de proteínas, lo mismo podemos observar en los sistemas de doble cruzade para el caso de ribosomas de tiempo cero con S_{100} de t_{18} y lavado ribosomal de

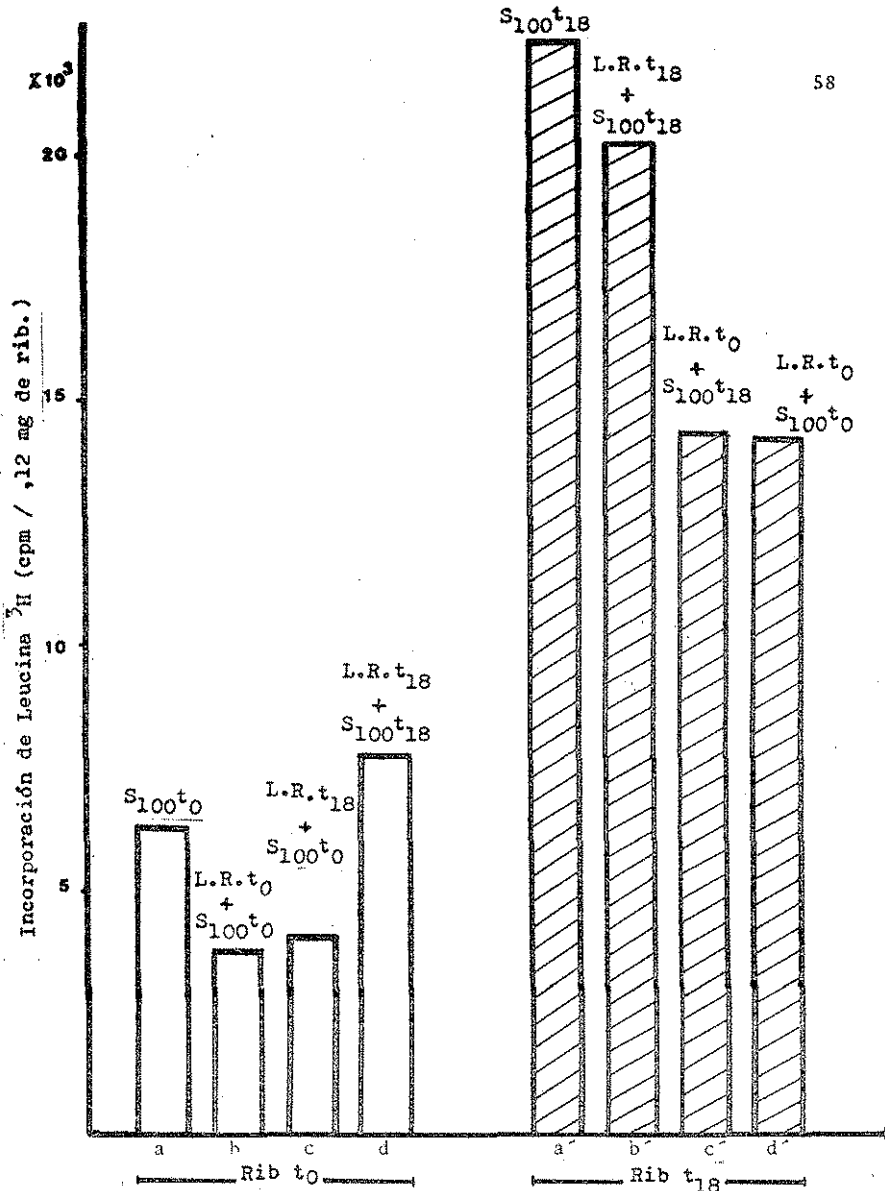


Fig. 13. Inhibición de la síntesis de proteínas por la adición de lavados ribosomales. 100 ug de ribosomas aislados de tejido fresco o envejecido fueron incubados con una mezcla de reacción para síntesis de proteínas en presencia del sobrenadante celular y en algunos casos con 100 ug del lavado ribosomal K₅₀₀ (L.R.) dializado.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

tiempo 18 h (b vs d) para el caso del sistema homogéneo del tiempo 0 al cual revierte la inhibición del L.R de t_{18} (c) dando por el contrario una estimulación de un 25%, gracias a la presencia de un mejor sobrenadante (d).

Sin embargo nos asaltó la duda de que este efecto inhibitorio por el lavado ribosomal se debiera en parte a una actividad proteolítica no obstante que Pérez (37) encontró que durante las primeras horas de incubación hay actividad proteolítica muy baja en el sobrenadante celular llegando a un máximo a las 48 h por lo tanto si la actividad inhibitoria fue se exclusivamente por la proteasa presente, la capacidad inhibitoria del lavado ribosomal debería ser en igual sentido. Se procedió a llevar a cabo una serie de experimentos con el inhibidor de proteasa fluoruro de fenil metil sulfonilo (PMSF).

Como se observa en la tabla 5 la actividad proteolítica encontrada en el L.R. t_0 es fuertemente inhibida a una concentración de 5 μM (64%) mostrandose la misma cuando el lavado ribosomal fue previamente calentado por 5 minutos a 90°C y un 16% más de inhibición cuando se incrementó 20 veces la cantidad de PMSF (100 μM). Debido a que se encontró la presencia de actividad proteolítica en el lavado ribosomal se hizo fuertemente determinante el estudiar si toda la actividad

Tabla 5. Actividad de proteasas en el lavado ribosomal a pH 7.6 en tejido fresco de Solanum tuberosum, L. Al lavado ribosomal liofilizado y dializado se le determinó el contenido de proteína por Lowry y una concentración equivalente de 0.46 mg de proteína por ml en el sistema de reacción fue lo que se empleó como fuente de enzima de medición. Otras características del sistema se indican en "materiales y métodos".

Ensayo	Preincubado 5 min-96°C	Actividad espe- cífica (U/mg de proteína).	% Actividad total	% Inhibi- ción.
-	-	40.81	100 %	-
+ 5 μ M PMSF	-	14.5	35.5	64.5
+ 50 μ M PMSF	+	16.1	39.5	60.5
+ 100 μ M PMSF	-	7.79	19.1	80.9

inhibitoria del lavado ribosomal previamente observada, fue se debido a esta actividad o a la presencia de algún(os) inhibidores de síntesis de proteínas. Es importante recordar que cuando el lavado ribosomal se precalienta pierde capacidad inhibitoria de síntesis de proteínas (fig 10), mientras que aparentemente la actividad proteolítica es estable al calor (tabla 5).

Se pensó entonces que si se inhibía la actividad proteolítica previamente en el lavado ribosomal y luego se adicionaba este lavado al sistema de incorporación, podría tratar de observarse si aún existía actividad inhibitoria de síntesis de proteínas en estos lavados, considerando la posibilidad de que cierto porcentaje de actividad proteolítica queda presente aún con 100 μ M de PMSF.

Con el fin de realizar estos experimentos fue necesario primero estudiar el efecto del PMSF sobre nuestro sistema de incorporación in vitro con el objeto de ver si era posible el realizarlos sin que su presencia en el sistema in vitro afectara fuertemente su eficiencia. Se probaron diferentes concentraciones del mismo (tabla 6), obteniéndose una fuerte inhibición de la incorporación de síntesis de proteínas tan alta como un 39% a una concentración de 0.1 mM de PMSF, sin embargo, utilizando una de 5 μ M podemos reducirla a un

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 6. Inhibición del sistema in vitro de síntesis de proteínas por el lavado ribosomal en tejido fresco de Solanum tuberosum, L., en presencia y ausencia de PMSF. El ensayo se realizó como se indica en materiales y métodos y al igual que en la tabla 5.

Exp. N.	Sistema completo	PMSF μ M	Lav. Rib. 100 μ g	cpm	% Actividad total	% Inhibición
1	"	-	-	4187	100	-
2	"	1.6	-	4210	100.5	-
3	"	5.0	-	3433	82.0	18
4	"	10.0	-	2060	49.2	50.8
5	"	100.0	-	2575	61.5	38.5
6	"	-	L.R.	2001	47.8	52.2
7	"	1.6	L.R.	2077	49.6	50.4
8	"	5.0	L.R.	1955	46.7	53.3
9	"	10.0	L.R.	1997	47.7	52.3
10	"	100.0	L.R.	1256	30.0	70.0
11	"	1 mM	L.R.	164	3.9	96.1

18% y es importante recordar que a esta concentración se inhibe un 64% la actividad proteolítica. La tabla 6 muestra comparativamente los resultados del sistema de incorporación en presencia de lavados ribosomales, medidos en presencia y ausencia del inhibidor de proteasas. En estos resultados podemos observar que aún en la presencia del inhibidor PMSF (para lo cual el lavado ribosomal fue previamente incubado por espacio de 30 minutos a 30°C) persiste la inhibición del sistema de incorporación de síntesis de proteínas sugiriendo que la misma puede ser debida a otra causa diferente a una actividad proteolítica (experimento 5 y 10).

3.5. Efecto de la adición del lavado ribosomal K_{300} sobre otro sistema de incorporación in vitro.

Con objeto de caracterizar un poco más la actividad inhibitoria de los lavados ribosomales provenientes tanto de tejido fresco como envejecido 18.0 h, éstos fueron adicionados a un sistema de incorporación in vitro de síntesis de proteínas de germen de trigo (fig. 14) utilizando dos tipos de ARNm: uno sintético (poli U) y otro natural (TMV). En ambos casos se presenta una fuerte inhibición de la incorporación del aminoácido radiactivo en presencia del lavado ribosomal de t_0 y t_{18} . Asimismo con ambos mensajeros, nuevamente se confirma que el lavado ribosomal de tiempo 0.0 h inhibe en ma-

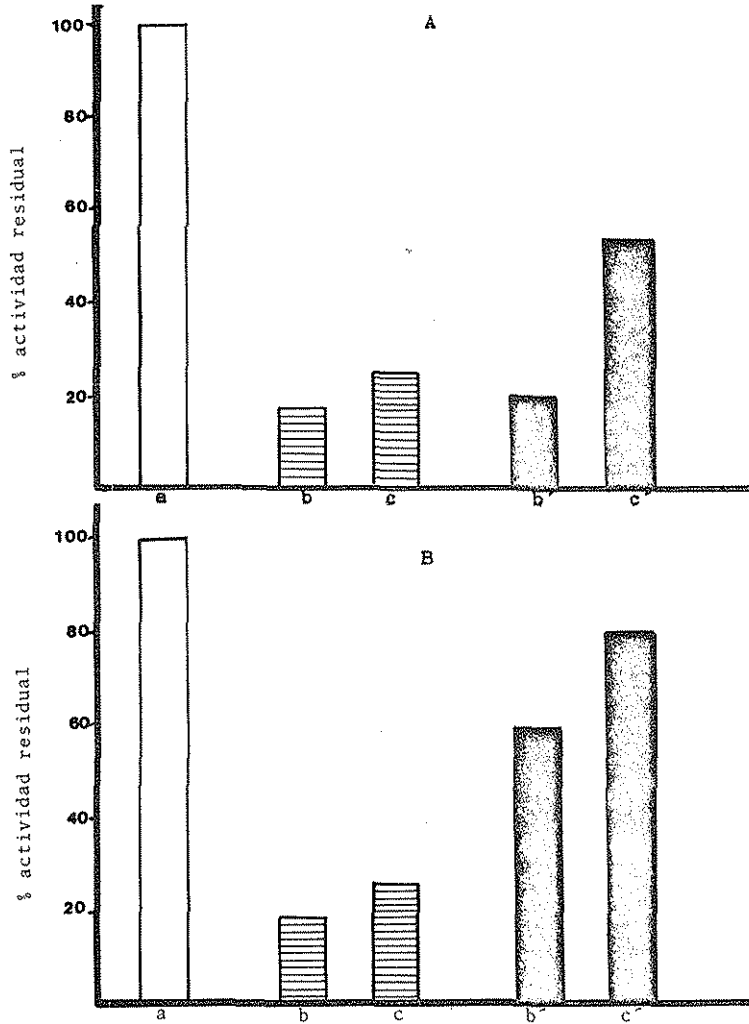


Fig. 14. Efecto de la adición del lavado ribosomal de tejido fresco e incubado sobre la síntesis de proteínas en un sistema de traducción *in vitro* de germen de trigo. El ARNm utilizado fue poli U(A) o ARNm-TMV (B), a) control. Al sistema de germen de trigo se le adicionaron 100 μ g de proteína de lavado ribosomal de tejido fresco (b, b') y envejecido 18 h (c, c') sin preincubar (b, b') o preincubado a 90°C por 5 minutos (c, c').

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

yor proporción que el de tiempo 18.0, además a semejanza de lo que ocurre en el sistema de papa al efectuar un calentamiento previo de los lavados ribosomales por 5 minutos a 90°C se presenta reversión de la inhibición (c y d'), siendo más marcado el efecto de reversión aparentemente con el lavado ribosomal que proviene de tejido envejecido.

5. D I S C U S I O N .

Como se ha descrito en la parte c rrespondiente a resultados, la primera parte de este trabajo consistió en el establecimiento del sistema de herida, esto es, un sistema de incubación de los tejidos cortados, de tal manera que pudieramos reproducir algunos de los parámetros característicos de la respuesta a la herida y tener así por lo tanto, la certeza de que las condiciones de trabajo empleadas eran las adecuadas. De acuerdo a los resultados presentados, esto quedó demostrado y podemos observar que bajo nuestras condiciones la ocurrencia de un aumento en el contenido ribosomal (fig. 1) paralelo a la formación de polisomas (fig. 5) y contenido de proteína (fig. 2 y 3) se encuentran localizados entre las 6.0 y 18.0 h después de efectuado el corte, la diferencia observada en los máximos de proteína obtenidos (6 y 18) se debe a dos causas posibles: 1) La proteína total determinada en la fig. 2 fue la que corresponde a aquella obtenida después de una homogenización y posterior centrifugación a 3 500 x g, mientras que la de la fig. 3 corresponde a aquella determinada en el sobrenadante postribosomal y 2) a veces aún determinando proteína sólo en sobrenadantes postribosomales se observa esta diferencia en máximos observados debido a la variabilidad del tejido, en cuanto a la respuesta obtenida, ya que aunque la tendencia es la misma, los máximos que presentan ciertos parámetros difieren de un lote de trabajo a

otro; posterior a este máximo de contenido de proteína se observó una caída en el mismo, lo cual es confirmado en los experimentos de incorporación in vivo (figs 3 y 4) tanto en la radiactividad del contenido de proteína liberada al sobrenadante celular como en la asociada a la fracción ribosomal; esta caída puede ser explicada no porque haya disminución de la síntesis de proteínas, sino a otras razones como son: 1) Un suministro inadecuado de marca radiactiva. No obstante que a las 12.0 h de incubación se probaron tres diferentes actividades específicas de marca radiactiva (50, 100 y 150 uC/ 0.5 g de tejido) y el número de cuentas por minuto obtenidas son aproximadamente similares, esta posibilidad no fue descartada completamente existiendo la posibilidad de que a estos tiempos, en donde se ha observado un aumento en los niveles de aminoácidos (37) la marca radiactiva se diluya. 2) Una mayor actividad proteolítica que se genere en respuesta a la herida, como lo ha reportado Pérez (37) en papa y que empieza a ser máxima alrededor de las 24 h y 3) Una actividad de RNasa que es óptima entre las 18.0 y las 24.0 h, como lo encontró Sacher (6) para tejido herido de camote.

Por otra parte, se ha reportado que en embriones de trigo (38) existen 2 pozas de aminoácidos, una de ellas es fuente directa para la síntesis de proteínas, mientras que la otra

poza que si es receptora de los aminoácidos suministrados exógenamente sólo está en equilibrio con la primera, en base a este antecedente se podría pensar que en nuestro sistema, en aquel tiempo en donde se observa la disminución de la incorporación de leucina marcada, hay un inadecuado flujo de aminoácidos hacia la poza suministradora de aminoácidos para la síntesis de proteínas y por lo tanto no importando la cantidad de marca suministrada, la misma no es incorporada a la proteína que se está sintetizando.

Para poder observar algunos de los componentes de la maquinaria de síntesis de proteínas, se hizo necesario el desarrollar un sistema de traducción in vitro el cual pudiese posteriormente ser reconstituido, al establecimiento del mismo nos encontramos que en el sistema "crudo", la capacidad de incorporación del aminoácido radiactivo suministrado era muy baja sobre todo en aquel proveniente de tejido fresco (tabla 1, segunda columna), por esto, no obstante que Ellis y MacDonald (26) utilizando también un sistema de traducción in vitro, en betabel como material de estudio, habían descartado la posibilidad de la presencia de un inhibidor disociable de síntesis de proteína, procedimos a llevar a cabo en las fracciones ribosomales un lavado por medio de una sal (cloruro de potasio) con el objeto de aumentar la eficiencia de la incorporación del aminoácido, ya que por un lado el lavado eliminaría residuos presentes del propio sobrenadante celular o bien por otro se localizaría

la fracción que impidiese un sistema de incorporación con mejor rendimiento. Fue interesante por lo tanto el observar que realmente obteníamos un incremento considerable, lavando los ribosomas con KCl, principalmente en tejido fresco (tabla 1, tercera columna), llegando a ser de 3 a 5 veces mayor con respecto al número de cuentas por minuto observadas en las preparaciones crudas para tejidos envejecidos. Cuando las condiciones del lavado del "pellet" ribosomal son más fuertes, es decir, al elevar la concentración final de la sal a 500 mM, la maquinaria de síntesis de proteínas es severamente afectada, al grado de no haber incorporación alguna en las preparaciones provenientes de tejido fresco y envejecido 8.0 h sin que se pierda completamente la incorporación en aquellos experimentos con fracciones de tejidos obtenidos después de 18.0 h de incubación (tabla 1, cuarta columna), probablemente porque a este tiempo la estabilidad de los polirribosomas presentes sea mayor. Si bien en el sistema K_{300} el número de cuentas por minuto aumentó con respecto al sistema crudo en los tres tiempos determinados, a las 8 h no se observó una estimulación (1.7 veces) como la obtenida en la preparación cruda a este mismo tiempo (9 veces). Sin embargo, en el sistema K_{300} si hay una clara estimulación de la incorporación entre el tiempo 0 h y 18 h (8 veces) los cuales fueron usados en la mayor parte de los experimentos llevados a cabo.

El sistema de incorporación utilizando ribosomas lavados con

KCl 300 mM fue optimizado con respecto a varios de sus componentes (figs 6 y 7) y como resultado final del rendimiento de incorporación logrado se puede observar en la tabla 3 que la estimulación obtenida con respecto a los ribosomas crudos de tiempo 0.0 h por efecto del lavado fue de 22.5 veces mientras que se logró hasta 128 veces si se compara el sistema de tejido fresco crudo con respecto al del tiempo 18.0 h de incubación. Esta marcada estimulación nos sugirió la posible presencia de un inhibidor que pudiese ser la causa de la pobre incorporación obtenida previamente en los sistemas crudos, notándose asimismo que está presente tanto en preparaciones provenientes de tejido fresco como en los de tejido incubado por varias horas después del corte y que aún después de eliminarlo notamos una actividad diferencial en los sistemas reconstituidos según el tiempo de incubación que se trate, es decir, no por eliminarlo de la fracción ribosomal de tiempo 0.0 h ésta se iguala en cuando a su capacidad para llevar a cabo la síntesis de proteínas con las preparaciones envejecidas como respuesta a la herida, sino que se sigue observando una mayor incorporación en éstas últimas.

Bajo estas condiciones se pudo intentar poner de manifiesto la diferencia tanto de las fracciones ribosomales como de los componentes del sobrenadante celular en cuanto a su capa

cidad de síntesis de proteínas in vitro comparativamente a diferentes tiempos de incubación del tejido cortado y de acuerdo a estos resultados podemos decir que tanto la fracción ribosomal como la citoplásmica tienen diferente capacidad de incorporación dependiendo del tiempo de incubación del tejido, debido a las siguientes evidencias: 1. Su comportamiento en los experimentos de cruza (ribosomas aislados de un tiempo + sobrenadante de otro tiempo), como se puede ver en la fig. 8. A una concentración constante de ribosomas, la mejoría del sobrenadante celular con el envejecimiento del tejido es notoria a cualquiera de las concentraciones de proteína probadas y llegando a saturación alrededor de 100-120 ug de proteína; por otro lado las fracciones ribosomales también mostraron esta misma diferencia (fig 9 b y c, tabla 4). 2. Su comportamiento en los experimentos de cruza en presencia del lavado ribosomal K_{300} (fig 13), ya que incluso llega a haber reversión de esta inhibición causada por el lavado en presencia de un sobrenadante postribosomal o una fracción ribosomal de mayor tiempo de envejecimiento y 3. Su comportamiento frente al lavado con cloruro de potasio a una concentración final de 500 mM, ya que como se ha citado anteriormente, a pesar de lo drástico de este tratamiento, el sistema de incorporación in vitro procedente de tiempo 18.0 h está aún activo con respecto a su contraparte "cruda".

El hecho de que podamos observar estas diferencias se logró

debido al tratamiento efectuado en las fracciones ribosomales ya que al eliminar al inhibidor se hace posible que respondan diferencialmente a los componentes del sobrenadante celular entre ellos ARN_m el cual según Kahl, Sato y Leaver (28, 29, 30) está restringido en preparaciones provenientes de tejido fresco pero que bajo nuestras condiciones experimentales de los cortes de tejido, es suficiente como para permitir una buena incorporación en sistemas lavados en los que se eliminó el inhibidor de tejido fresco en ausencia de un mensajero exógeno; lo cual puede ser explicado ya que previamente Ellis y MacDonal (26) habían encontrado que otros componentes de la maquinaria de síntesis de proteínas tales como enzimas activantes, ARN_t y el nivel de ATP se encuentran en tejido fresco en cantidad suficiente como para observar una buena incorporación in vitro y además procuramos que nuestros sistemas de incorporación estuvieran en igualdad de condiciones con respecto a la presencia de estas variables y en concentraciones no limitantes en el sistema de medición. Aún así no podemos atribuir todo el aumento en la síntesis de proteínas en los sistemas reconstituídos de tejido herido comparativamente contra los de tejido fresco exclusivamente a la eliminación del inhibidor por medio del lavado, ya que como Lin (27) lo ha reportado en tejido de zanahoria, hay presencia de dos bandas de proteínas asociadas a ribosomas provenientes de tejido enveje-

cido que no aparecen en tejido fresco y que podrían estar involucradas para dar una mayor eficiencia en la incorporación, quedando entonces la posibilidad de efectuar experimentos similares y más directos en papa y ver si efectivamente si existen bandas de proteína asociadas a ribosomas de tejidos envejecidos que presentan activación de síntesis de proteínas.

Por otra parte en estos experimentos también se evidenció que el sobrenadante celular, fuente de factores necesarios para llevar a cabo la síntesis de proteínas es más activo con el tiempo en que es incubado el tejido, atribuible a como se ha sugerido anteriormente a un aumento o activación de ARNm principalmente entre otros factores que pueden aumentar por el efecto de la herida y que se manifestaría por inducir ARNm de proteínas asociadas a la respuesta de herida.

En vista del incremento en la incorporación del aminoácido radiactivo, logrado por medio del lavado ribosomal, llevamos a cabo experimentos encaminados a confirmar el efecto inhibitorio de este lavado sobre nuestro sistema de traducción in vitro, encontrándonos con la presencia de una actividad inhibitoria, tanto en el procedente de tejido fresco como en el tejido envejecido (fig. 11).

Aunque aparentemente esta actividad inhibitoria es diferencial ya que es mayor en el lavado ribosomal proveniente de tejido fresco que en el de tejido envejecido, no obstante que adicionabamos la misma cantidad por contenido de protefina por sistema, (fig. 13, 14), existe la posibilidad de que ambos lavados ribosomales sean igualmente inhibitorios, pero que la concentración del inhibidor en aquel lavado aislado de tejido incubado 18 h es mucho menor que en el de tiempo 0 h y por eso se expresa en menor grado, asimismo observando los resultados presentados en la fig. 13 (b vs c y c vs b) pareciera que la mencionada actividad inhibitoria se expresa en forma diferente dependiendo del sobrenadante celular presente, es decir el S_{100} procedente de tejido envejecido inhibe la inhibición causada por los lavados ribosomales, debido posiblemente a la presencia de algún agente regulador de esta actividad, el cual está ausente en el S_{100} procedente de tejido fresco, quedando así la posibilidad de llevar a cabo posteriores investigaciones en esta área.

No habiendo reporte alguno acerca de este inhibidor y establecido su aparente carácter proteico, manifestado por su inestabilidad al calor (fig. 10, 14) se procedió a descartar la posibilidad de que esta baja incorporación se debiera a una actividad proteolítica ya sea en si mismo o debido a una contaminación por parte del sobrenadante celular en el mo-

mento del aislamiento de ribosomas ya que como se ha citado, Pérez (37), encontró en este sobrenadante un aumento en la actividad proteolítica en respuesta a la herida, siendo máxima entre las 24 y 48 hr a un pH de 5.7 mientras que cuando fue determinada a un pH 7.6 (pH del sistema de traducción) la actividad proteolítica fue casi nula. Para determinar si existía actividad proteolítica en el lavado ribosomal, se midió esta enzima al mismo pH del sistema de incorporación, encontrándose actividad presente en los lavados ribosomales de tejido fresco la cual es inhibida por PMSF hasta en 60%. No obstante la actividad proteolítica presente en los lavados ribosomales, no es causa total de la inhibición observada, ya que en presencia del inhibidor de proteasa PMSF (tabla 6) podemos observar aproximadamente 15% de inhibición que atribuimos a algún componente del lavado ribosomal (tabla 6, exp. 5 y 10).

Si bien los datos presentados en las figs. 5 y 6 sólo son sugerentes con respecto a que no toda la inhibición causada por el lavado ribosomal se debe a una actividad de proteasa, existen otros hechos que apoyan esta sugerencia como lo es el que la actividad proteolítica encontrada en el lavado ribosomal de tejido de tiempo 18.0 h fue mayor que la del tiempo 0 h, y si se recuerda en cuanto a su capacidad inhibitoria sucede lo contrario, además como se muestra en

la tabla 5 la proteasa determinada en to es estable al calor mientras que la inhibición no (fig. 10, 14).

De acuerdo a lo anteriormente presentado, podemos concluir que: 1. El aumento en la capacidad de síntesis de proteínas en respuesta a la herida en tejido de almacenamiento de papa, se debe a cambios tanto en las fracciones ribosomales como citoplásmicas; 2. Existe un inhibidor de síntesis de proteínas asociado a ribosomas cuya actividad o concentración va desapareciendo de manera directa al tiempo de envejecimiento del tejido y 3. Esta actividad inhibitoria no se debe exclusivamente a una actividad de proteasa. De aquí que nosotros interpretemos los resultados como una implicación de que los ribosomas de tejido fresco son menos eficientes debido entre otras cosas a la presencia de este inhibidor extraíble por sal, el cual con el paso del tiempo va perdiendo actividad o concentración a la vez que los componentes del sobrenadante celular son enriquecidos con factores necesarios o que ayudan a la estimulación de la síntesis de proteínas.

Resultados preliminares llevados a cabo para investigar el mecanismo por el cual es inhibida la síntesis de proteínas por el lavado ribosomal, procedente de tejido fresco, fueron hechos comparando las cinéticas de esta inhibición con aque-

llas producidas por un inhibidor de elongación conocido como es la cicloheximida, encontrándose semejanza entre ambas. La posibilidad de una inhibición en algún paso del mecanismo de síntesis de proteínas viene aunado a lo observado en los experimentos de cruza que se realizaron en presencia de metionina ^3H (tabla 4) en donde el incremento obtenido con este aminoácido muestra la misma tendencia que cuando se utiliza leucina, sin embargo la eficiencia de incorporación es marcadamente menor reflejando que el por ciento de incorporación de metionina en proteína sintetizada es mucho menor y posible indicador del grado de reinicio de la síntesis de proteínas en el sistema in vitro, el cual viene a ser de 2.5 veces superior en tejido envejecido por 18 h comparativamente con el fresco. De acuerdo a los resultados presentados aquí, es evidente que se hace necesario realizar un estudio más profundo del lavado ribosomal con el fin de caracterizar al inhibidor presente en el mismo así como tratar de elucidar su mecanismo de acción. Como se ha citado en la introducción, los cambios observados durante la respuesta a la herida se asemejan con aquellos que ocurren cuando un órgano de almacenamiento pasa del estado latente al brotado y por lo tanto estos estudios podrían dar luz acerca de cuales son los mecanismos que lo controlan, teniendo en cuenta además que es necesario correlacionar los resultados obtenidos in vitro con lo que sucede in vivo y en toda la planta.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5. BIBLIOGRAFIA .

1. Kahl, G.: Metabolism in plant storage tissue slices. Bot. Rev. 40, 263-314 (1974).
2. Thimann, K.V. : Senescence in plants. Vol. I, Cap. I, 1-2. CRC press, (1978).
3. Stumpf, P.K., Conn, E.E. : The Biochemistry of plants, Vol. II, Cap.11, 463-484, Davies, D. ed., (1978).
4. Takamura, T., Uritani, I. : Agr. Biol. Chem., 41, 1141-1145 (1973).
5. Oba, K., Furuse, K., Uritani, I., Plant & Cell Physiol., 19, 741-747 (1978).
6. Sacher J.A., Tseng, J., Williams, R., Cabello. A. : Wound-induced RNase activity in sweet potato. Plant Physiol., 69, 1060-1065 (1982).
7. Zucker, M. : Sequential induction of phenylalanine ammonia-lyase-inactivating system in potato tuber disks. Plant Physiol., 43, 365-374 (1968).
8. Tanaka, Y., Kazunobu M., Uritani, I. : Some investigations of inactivation of phenylalanine ammonia-lyase in cut-injured sweet potato root tissue. Plant & Cell Physiol. 18, 1209-1216 (1977).
9. Van Steveninck, R.F.M. : The "washing" or "aging" phenomenon in plant tissues. Ann Rev. Plant Physiol., 26, 237-258 (1975).
10. Kahl, G. : Biochemistry of wounded plant tissue. Walter de Gruyter, Berlin, pp. 287-309, 623-671 (1978).
11. Castelfranco, P.A., Tang, W., Bolar, M.L. : Membrane transformations in aging potato slices. Plant Physiol., 48, 795-800 (1971).
12. Asahi, T., Reiko, M. : Effect of antibiotics on biogenesis of mitochondria during aging of sliced sweet potato root tissue. Plant & Cell Physiol., 10, 317-323 (1969).

13. Forde, B.G., Oliver, R.J., Leaver, C.J. : In vitro study of mitochondria protein synthesis during mitochondrial biogenesis in excised plant storage tissue. *Plant Physiol.*, 63, 67-73 (1979).
14. Stuart, D.A., Varner, J.E. : Purification and characterization of a salt-extractable hydroxyproline-rich glycoprotein from aerated carrot disc. *Plant. Physiol.*, 66, 787-792 (1980).
15. Smith, M.A. : Characterization of carrot cell wall protein. *Plant Physiol.*, 68, 964-968 (1981).
16. Davies, E., Schuster, A. : Intercellular communication in plants: Evidence for rapidly generated, bidirectionally transmitted wound signal. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 75, 2422-2426 (1981).
17. Ap Rees, T., Bryant, J.A. : Effects of cycloheximide on protein synthesis and respiration in disks of carrot storage tissue. *Phytochem.*, 10, 1183-1190 (1971).
18. Click, R.E., Hackett, D.P. : The role of protein and nucleic acid synthesis in the development of respiration in potato tuber slices. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 50, 243-250 (1963).
19. Kanazawa, Y., Asahi, T., Uritani, I. : Change of B-Type hem content in relation to peroxidase biosynthesis in injured sweet potato roots. *Plant & Cell Physiol.*, 8, 249-262 (1967).
20. Laties, G.G. : Inhibition of RNA and protein synthesis by chloral in potato slices. *Plant. Physiol.*, 40, 1237-1241 (1965).
21. Thimann, K.V., Loos, G.M. : Protein synthesis during water uptake by tuber tissue. *Plant. Physiol.*, 32, 274-279 (1957).
22. Verleur, J.D., Weststeyn, E.A., Haan-Stoffels de, H. : Nitrogen metabolism in white potato tissue infected with fungi changes in the alcohol-soluble and insoluble nitrogen fractions. *Plant & Cell Physiol.*, 7, 291-300 (1966).
23. Castelfranco, P., Tang, W., Bolar, M.L. *Plant Physiol.*, 48, 795-800 (1971).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

24. Chapman, J.M., Edelman, J. : Relationship between protein synthesis in tuber discs and the protein synthetic activity of a cell free preparation. *Plant Physiol.*, 42, 1140-1146 (1967).
25. Sakano, K., Asahi, T. : Activation of protein synthesis and biogenesis of mitochondrial particles during aging of discs of sweet potato root tissue. *Agr. Biol. Chem.* 33, 1433-1439 (1969).
26. Ellis, R.J. Mac Donald, I.R. : Activation of protein synthesis by microsomes from aging beet disks. *Plant Physiol.*, 42, 1297-1302 (1967).
27. Lin, C.Y., Travis, R.L., Chia, L.S.Y., Key, J.L.;-: Changes in ribosomal activity during incubation od Daucus carota root disks. *Phytochem.*, 12, 2810-2807 (1973).
28. Leaver, C.J., Key, J.L. : Polyribosome formation and RNA synthesis during aging of carrot root tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 57, 1338-1344 (1967).
29. Kahl, G. : Activation of protein synthesis in aging potato tuber slices. *Naturfosch.*, 26, 1064-1067 (1971).
30. Sato, T., Izhuka, M. Watanabe, A., Imaseki, H. : The synthesis and properties of polysomal RNA in potato tuber slices during the early stage of aging. *Plant & Cell Physiol.*, 21, 137-147 (1980).
31. Wielgat, B., Kahl, G. : Enhancement of polyribosome formation and RNA synthesis of giberellic acid in wounded potato tuber tissue. *Plant Physiol.*, 64, 863-866 (1979).
32. Lowry, O., Rosebrough, N. : Protein measurement whit the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275 (1951).
33. Román, R., Brooker, J.D., Seal S.N., Marcus, A. : Inhibition of the transition of a 40 S ribosome-met- $tRNA_i^{met}$ complex to an 80 S ribosome-met- $tRNA_i^{met}$ complex by 7-methylguanosine-5'-phosphate. *Nature* 260, 359-360 (1976).
34. Miller, B. : Partial purification and characterization of endoproteinases from senescing barley leaves, *Plant Physiol.*, 68, 930-936 (1981).
35. Drivdahl, R.H., Thimann, K.V. : Proteases of senescing oat leaves, *Plant Physiol.*, 61, 501-505 (1978).

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

36. Weilgat B., Wechselber M., Kahl G. : Age-variations in transcriptional response to wounding and gibberellic acid in a higher plant. *Planta*, 147, 205-209 (1979).
37. Pérez, B. C.A. Poliaminas y actividad proteolítica en tejido herido de Solanum tuberosum, L. Tesis licenciatura, Facultad de Química, UNAM (1983).
38. Marsh, L., Datta, K., Marcus, A. : Germination of wheat embryos and transport of aminoacids into a protein synthesis precursor pool. *Plant Physiol.*, 70, 67-73 (1982).