

113.  
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



GRUPO PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

"REGULACION DE LA TRADUCCION DE LAS  
PROTEINAS ACIDAS RIBOSOMALES (PRAs)  
DURANTE LA GERMINACION EN MAIZ"

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P R E S E N T A:

**ALFONSO SUAREZ ZERMEÑO**



México, D.F.

1995

FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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: ESTELA SANCHEZ DE JIMENEZ  
Vocal JORGE MANUEL VAZQUEZ RAMOS  
Secretario ANA ESTHER AGUILAR CARDENAS  
1er. Suplente ROGELIO RODRIGUEZ SOTRES  
2do. Suplente MANUEL BENIGNO AGUILAR RAMIREZ

**SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:**

Departamento de Bioquímica, División de Bioquímica  
y farmacia. División de Estudios de Posgrado. Facultad de  
Química, U.N.A.M.

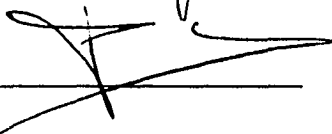
Asesor del tema:

Dra. Estela Sánchez de Jiménez



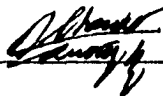
Supervisor Técnico:

M.C. Raúl Genaro Aguilar Caballero



Sustentante:

Alfonso Suárez Zermeno



**Este proyecto de investigación fue apoyado por el programa de la Dirección General de Asuntos de Personal Académico (DGAPA) en el proyecto IN200793 "Regulación de la síntesis de proteínas en embriones de maíz durante la germinación". El sustentante fungió como Ayudante de Investigador dentro del Sistema Nacional de Investigadores y también participó dentro del Programa de Iniciación Temprana a la investigación de la Fundación UNAM.**

Yo me permití utilizar una hoja de mi tesis para escribir algunos pensamientos que aunque nada tienen que ver con la bioquímica creo que son valiosos para cualquier mexicano, de esta manera alguien que no tuviera las ganas de entenderla puede llevarse algo de ella para sí mismo.

Pocos momentos se recuerdan en la historia que sean menos fáciles para México como el momento actual. Después de haber vivido durante algunos años en la ilusión de haber entrado al primer mundo, el sueño se rompió primero en Chiapas y luego se transformó en un sentimiento de depresión e impotencia. Los mexicanos sentimos que se burlan de nosotros, al menos los que tenemos conciencia; el gobierno ha vendido todo desde las empresas paraestatales (que en un principio parecía algo sano) hasta haber hipotecado el petróleo y el gas natural, en estos días se anuncia la venta de las petroquímicas del país. ¿Que nos falta o mejor dicho LES falta por vender? ¿El territorio? O a caso el mismo México también tiene valor en dólares. Juárez decía: "entre defender a la madre con la vida y venderla no hay término medio honroso" y rechazó la idea de pactar con Maximiliano. Los tiempos se repiten y es justo que nosotros defendamos a nuestra madre Patria, ya que no solamente defenderemos un pedazo de terreno, defenderemos los anhelos y la esperanza de generaciones, defenderemos aquellos ideales que hacen que el hombre se eleve por encima de los demonios y nótese que no digo por encima de los animales. Pero esta defensa no se puede dar con las armas. En toda la historia de la humanidad no ha habido un solo caso en que un pueblo halla alcanzado verdaderamente la libertad o la armonía por medio de la violencia, las grandes revoluciones lo único que han hecho es cambiarle el nombre a las víctimas y a los verdugos. La raíz de los males de nuestro país en estos momentos es que nos hace falta **CONCIENCIA**, estamos como dormidos porque de qué otra manera podríamos explicar que seguimos manteniendo en el poder al mismo sistema que **TODOS** los mexicanos sabemos que es corrupto y que está demostrado que ha permitido que tan solo los presidentes hallan robado 40 ó 60 mil millones de dólares. De qué otra manera sino es precisamente por falta de **CONCIENCIA** podemos explicar que los mexicanos estemos acabando con nuestro medio ambiente, tiremos basura en la vía pública, hagamos fraudes, robamos y que nos quejemos del gobierno, pero pensando en que nos gustaría ser diputados para ganar un buen sueldo y no tener que trabajar. Algunos le llaman educación, yo le llamo **CONCIENCIA**. Nuestro país tiene una misión que cumplir y el primer punto consiste en despertar a la población y la pregunta obligada es:

¿Qué estás haciendo Tú para tener mayor conciencia?

**LA MUJER DORMIDA HA DADO A LUZ.**

## **ABREVIATURAS**

<b>PRAs</b>	Proteínas ácidas del ribosoma
<b>eIF</b>	Factor de iniciación eucariote de la síntesis de proteínas
<b>eEF</b>	Factor de elongación eucariote de la síntesis de proteínas
<b>eRF</b>	Factor de terminación eucariote de la síntesis de proteínas
<b>RNA poliA</b>	RNA poliadenilado
<b>Ac</b>	acetato
<b>RPM</b>	Revoluciones por minuto
<b>PVDF</b>	Difluoruro de polivinilo

# INDICE

<b>I.</b>	<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>II</b>	<b>INTRODUCCION</b>	<b>3</b>
<b>III</b>	<b>ANTECEDENTES</b>	
	Generalidades de síntesis de proteínas	7
	Síntesis de proteínas en eucariotes	11
	Mecanismos de control en la síntesis de proteínas	16
	Función de las proteínas ácidas del ribosoma (PRAs)	18
<b>IV</b>	<b>METODOLOGIAS</b>	
	Preparación del material biológico	25
	Experimentos para obtener proteínas ribosomales y citoplásmicas	27
	Análisis por Western blot	29
	Cuantificación y síntesis de PRAs	31
	Identificación de los mRNA de las PRAs	32
	Manejo de Sondas Moleculares	37
	Análisis por Northern blot	40
<b>V</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>44</b>
<b>VI</b>	<b>DISCUSION DE RESULTADOS</b>	<b>54</b>
<b>VI</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>59</b>
<b>VII</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>60</b>
<b>VII</b>	<b>APENDICE</b>	<b>64</b>

## I.-RESUMEN

En las semillas de la mayor parte de las plantas superiores la maquinaria para la síntesis de proteínas se encuentra presente y puede iniciar su funcionamiento (Weil & Partier 1982; Marcus., 1982), pero es hasta que la semilla se hidrata (y está en presencia de condiciones favorables de luz y temperatura) que esta maquinaria inicia su actividad.

La pieza fundamental de la maquinaria traduccional es el ribosoma, partícula compuesta por RNAr y proteínas. Todas las proteínas ribosomales son de naturaleza básica a excepción de un juego de proteínas muy relacionadas entre sí y que son de carácter ácido. Estas proteínas se han estudiado en una gran cantidad de células de diversos orígenes, algunos ejemplos son en hígado de rata (Stöffler et al., 1974; Reyes et al., 1977) y humano (Rich & Steitz, 1987), *Artemia salina* (Möller et al., 1975), levadura (Kruiswijk & Planta 1975; Zinker & Barner, 1976; Juan-Vidales et al., 1984), células de Krebs II (Leader & Coia, 1977), células HeLa (Horak & Schiffmann, 1977), *Drosophila melanogaster* (Chooi et al., 1980), *Tetrahymena piriformis* (Sandermann et al., 1979), germen de trigo (Madrzak et al., 1979), reticulocitos (Howard et al., 1976), *Trypanosoma cruzi* (Schijman et al., 1992) y otros, pero hasta el momento no se tiene conocimiento exacto del papel de estas proteínas en el proceso de síntesis de proteínas.

En este trabajo se trató de elucidar a qué nivel se regula la expresión de estas proteínas durante la germinación del maíz con el objeto de ampliar el conocimiento del papel de estas proteínas en relación a la síntesis de proteínas durante la etapa de germinación. Con este fin las proteínas ribosomales ácidas (PRAs) se identificaron por medio de anticuerpos en análisis de Western blot en extractos de ejes de maíz secos y de diferentes horas de germinación. Se encontró que las PRAs están unidas en baja proporción al ribosoma de ejes embrionarios de semillas maduras y por medio de un experimento de síntesis in vivo (en donde se administró el aminoácido radioactivo metionina <sup>35</sup>S para que se incorpore en las proteínas en formación de las células) se encontró que hay un incremento fuerte en la síntesis de estas proteínas a las 24 horas de germinación. La inhibición de la síntesis del mRNA por tratamiento con  $\alpha$ -amanitina no tuvo efecto en la síntesis de estas proteínas. También se buscó la presencia de el mRNA de PRAs en ejes de maíz seco y a diferentes horas de germinación por medio de Northern blot y se encontraron señales probables de los mensajes para estas proteínas tanto en ejes secos como a diferentes horas de la germinación. Esto nos indica que las PRAs se encuentran



listas en las semillas secas para ejercer su función durante la germinación y posteriormente se empiezan a sintetizar a partir de mensajes almacenados en la semilla.

## II.- INTRODUCCION.

El maíz (*Zea mays* L) es una planta anual de la familia *Gramineae*, es la planta de cereal más alto ya que puede alcanzar alturas hasta de 4,5 metros. Esta planta posee flores masculinas, que nacen en la parte superior del tallo y flores femeninas (que darán lugar a la mazorca) que nacen en una unión axilar del tallo.

El maíz se encuentra entre los cuatro principales cultivos del mundo (los otros son trigo, arroz y papa) y el mayor productor son los Estados Unidos de Norteamérica con una producción que equivale al 40 % de la producción mundial. Se estima que alrededor del mundo se siembran 132 millones de hectáreas con una producción de 477 millones de toneladas métricas de maíz. Entre los países que dedican grandes extensiones de terreno para el cultivo de este cereal se encuentran Estados Unidos, China, Brasil, Rusia, México, Argentina, Rumania, Francia, India y Sudáfrica.

Por restos arqueológicos se sabe que una planta, llamada teosintle, parecida al maíz actual se consumía en México desde hace al menos unos 7000 años. La adaptación, domesticación y selección a lo largo de esos años, junto con el avance de la ciencia y tecnología, han introducido cambios importantes en el cultivo de esta planta.

Fue hasta 1930 que se obtuvieron variedades híbridas que han aumentado enormemente la calidad y productividad de el maíz. En 1988 se hizo la primera introducción de un gene a células de maíz (Grotier, 1993), con la consiguiente opción de producir plantas transgénicas.

La productividad se ha incrementado pues en 1931 se obtenían rendimientos promedio de 1538 kg de semilla por hectárea cosechada en los Estados Unidos. En 1985 el rendimiento promedio en este país alcanzó los 7408 kg/hectárea.

Pero también la mecanización del campo ha jugado un papel relevante para la intensificación de este cultivo. Tomemos como ejemplo que antes de 1930 se necesitaban más de 30 minutos para desgranar mazorca y obtener 25 kg de semilla. Actualmente este procedimiento requiere de menos de 3 minutos.

Actualmente el maíz se utiliza principalmente para alimentar directamente al ser humano, aunque en los Estados Unidos la mitad de la producción se utiliza para alimentar ganado.

Sin embargo también existen otros usos: el tallo es usado como forraje, el olote (mazorca ya sin las semillas) como materia prima para extraer furfural (Adams & Voorhees, 1941), la semilla se utiliza extensamente en las industrias fermentativa y de destilación, en la producción de aceites comestibles y de diversos azúcares y jarabes.

Uno de los aspectos biológicos de mayor interés es el proceso conocido como germinación, ya que si éste no se lleva a cabo correctamente no será posible obtener plantas y semillas nuevas, además de que indirectamente puede disminuir el valor alimenticio de éstas últimas. Si bien no se tiene una definición formal de germinación, nosotros emplearemos este término para describir a todos los procesos que transcurren desde que la semilla se pone en contacto con agua hasta que la radícula protruye a través de la testa.

Normalmente una semilla no germinará hasta que haya tenido un periodo de crecimiento y desarrollo, que halla acumulado suficientes reservas y, en la mayoría de los casos, pasado por un proceso de secado. En este momento se dice que está en una etapa **quiescente** (actividad metabólica disminuida al máximo posible) y puede ser guardada por meses o años sin sufrir deterioro. Sin embargo al ponerse nuevamente en contacto con agua se hidrata y entra en una nueva fase de actividad.

Se reconocen tres fases dentro de la germinación:

1) Imbibición.- Al entrar en contacto con agua, la semilla entra en un periodo de absorción rápida de agua que puede variar entre 5 y 10 minutos en soya (Parrish & Leopold, 1977) hasta más de 30 minutos en chícharo (Waggoner & Parlange, 1976). Después entra a un periodo de toma lenta y lineal de agua que puede durar entre 5 y 10 horas.

2) Fase lag.- La semilla humectada se vuelve más pesada y metabólicamente más activa. En trigo esta fase se extiende entre 40 minutos y 5 horas después de haber comenzado la imbibición (Spiegel & Marcus, 1975).

3) Fase de germinación.- Este periodo se caracteriza por el crecimiento de alguna parte del embrión (generalmente la raíz) que finalmente rompe la testa.

Por experimentos de inhibición se sabe que no existe germinación si la síntesis de proteínas o de RNA se bloquea (Brooker et al., 1977). De hecho se ha detectado que la síntesis de proteínas comienza incluso solo una hora después del comienzo de la imbibición en embriones de trigo (Marcus et al., 1966), cebada (Stoddart & Thomas, 1973) y centeno (Sen et al., 1975). Esto sugiere que la mayor parte de los componentes bioquímicos y estructurales que se requieren para sintetizar estas macromoléculas deben estar presentes en la semilla seca. Se sabe que en trigo se encuentra RNA de transferencia y aminoacil RNAt sintetasas (Weil & Partier, 1982) junto con factores de iniciación y elongación (Marcus, 1982).

En cuanto al RNA mensajero (RNAm) se ha visto que también se encuentra almacenado en las semillas de trigo y se ha visto que es el responsable de la síntesis de proteínas en los primeros 40 minutos (Spiegel & Marcus, 1975). Sin embargo, en la fase lag de la germinación la transcripción de nuevo RNAm es responsable de generar un cambio en el patrón de síntesis de proteínas.

Las proteínas del ribosoma juegan un papel importante para que éste pueda llevar a cabo su función en el proceso de síntesis de proteínas. Se ha visto que ciertas proteínas de carácter ácido (denominadas P0, P1 y P2 en eucariotes) son necesarias para llevar a cabo un aspecto del proceso de traducción en el ribosoma. Se les ha estudiado en células de organismos pertenecientes a todos los reinos biológicos y los modelos de estudio abarcan desde levaduras hasta mamíferos, pasando por *Artemia salina* y oocitos de *Xenopus*; sin embargo poco se ha estudiado en plantas y no es muy claro el papel de estas proteínas en la germinación.

El aporte del presente estudio radica en que el maíz (*Zea mays* L.), además de ser económicamente importante a nivel mundial, es un modelo de estudio interesante puesto que la maquinaria bioquímica para la síntesis de proteínas de las semillas en estado quiescente tiene peculiaridades que no presentan las células en crecimiento exponencial del resto de los

modelos donde se han estudiado estas proteínas (denominadas en general **proteínas ribosomales ácidas ó PRAs**), lo que puede arrojar nuevos datos sobre la función de las PRAs en el ribosoma durante la síntesis de proteínas en general.

Como se mencionó, la síntesis de proteínas es un proceso clave durante la germinación de las semillas y si las PRAs están involucradas cabría preguntar cuando son requeridas y cuando se sintetizan, es decir tendríamos que saber como son reguladas en el proceso de la germinación. Para aportar información acerca de esta pregunta hemos desarrollado este proyecto de investigación enmarcado en la siguiente hipótesis de trabajo:

**Hipótesis:** La expresión de las **PRAs** se regula a nivel traduccional durante el proceso de germinación de la semilla.

Los objetivos generales del proyecto fueron los siguientes:

- 1) Determinar la presencia de estas proteínas en ejes embrionarios de maíz seco.
- 2) Determinar la presencia del(os) RNAm de estas proteínas en ejes embrionarios de maíz seco.
- 3) Monitorear la expresión de las PRAs durante las 24 horas de germinación.

Los experimentos realizados en el laboratorio de bioquímica vegetal para elaborar la presente tesis se pueden dividir en dos etapas: la primera incluye los experimentos necesarios para identificar a las PRAs de maíz; y la segunda etapa incluye los experimentos de biología molecular que fueron necesarios para identificar los RNAm correspondientes a estas proteínas.

### III.-ANTECEDENTES

Uno de los procesos claves en la vida de los organismos, no importa que tan evolucionados sean, es la síntesis de proteínas. Estas forman parte integral de la estructura de células y tejidos, además la actividad bioquímica de las células radica en ellas y son una de las macromoléculas más abundantes de los seres vivos.

Entre las funciones biológicas más importantes que llevan a cabo las proteínas se pueden considerar:

a) **Catálisis enzimática:** Existen ciertas proteínas que pueden catalizar las reacciones químicas celulares al disminuir la energía de activación de las mismas, haciendo posible que éstas se lleven a cabo dentro de la célula, o fuera de ella, en condiciones ambientales. A estas proteínas se les llama enzimas y forman un grupo extremadamente extenso y heterogéneo. Si tenemos en cuenta que hay células que cada segundo llevan a cabo 100,000 reacciones bioquímicas en las cuales participan enzimas, nos podremos dar una idea de la gran cantidad y variedad de estas macromoléculas que debe poseer cada célula.

Las enzimas están involucradas en una multitud de procesos tales como: los procesos de obtención y almacenamiento de energía (fermentación, respiración, ciclo de Krebs, lipólisis, gluconeogénesis, glucogenólisis, fosforilación oxidativa, fotosíntesis, etc); de síntesis (desde ácidos grasos hasta hormonas pasando por biopolímeros como celulosa) y degradación e inactivación de moléculas (desde aminoácidos hasta productos exógenos como medicamentos) y finalmente en todos los procesos de reparación y crecimiento celular.

b) Las proteínas participan también en otras funciones especializadas en los organismos como: el transporte de gases (como la hemoglobina), de iones (como calmodulina), de cofactores o vitaminas y de hormonas; la contracción y movimiento celular. Forman parte ya sea del flagelo de las bacterias hasta el músculo de los mamíferos (como actina, miosina, tubulina); la protección inmunológica de los animales superiores (como los anticuerpos); la acción hormonal (como la hormona del crecimiento, la insulina y otras hormonas peptídicas); formando la parte estructural de los tejidos (como la colágena), como

receptores de hormonas y señales de reconocimiento intercelular; e interaccionando con ácidos nucleicos para darles estabilidad e incluso modificar su expresión y funcionamiento.

Tendríamos que terminar esta lista con un largo etcétera, pero ella nos sirve para entender la importancia de las proteínas en los seres vivos. Por tanto, sabiendo que las proteínas son sintetizadas dentro de la célula, se requiere de una maquinaria intracelular capaz de producirlas rápidamente, en el momento adecuado, en cantidades suficientes y precisas y sin error en su secuencia de aminoácidos.

La secuencia química del ácido desoxirribonucleico (DNA) contiene la información que dirige la síntesis de proteínas. El DNA es una macromolécula larga que está formado por monómeros de nucleótidos. Cada nucleótido tiene tres elementos: una base púrica (adenina o guanina) o una base pirimidínica (timina o citocina), un azúcar (desoxirribosa) y el grupo fosfato. A la secuencia de tres nucleótidos se le llama triplete o codón y tiene la información genética para uno y solo un aminoácido. La secuencia de nucleótidos determina, por tanto, la secuencia de aminoácidos en la proteína.

La síntesis de proteínas requiere de otros elementos que mencionaremos a continuación:

Se requiere de otro ácido nucléico: el ácido ribonucleico o RNA. Este difiere del DNA por que contiene otro tipo de azúcar (ribosa) y la timina está reemplazada por otra base que es uracilo. Son necesarios tres tipos de RNA para llevar a cabo la síntesis de proteínas: el RNA mensajero (mRNA), que transcribe la información genética del DNA; el RNA de transferencia (tRNA), que lleva al aminoácido apropiado al sitio de la síntesis de proteínas, y el RNA ribosomal (rRNA), que está asociado con los ribosomas.

Para llevar a cabo la síntesis de proteínas el fragmento de DNA que contiene la información para una proteína específica se usa como plantilla para hacer RNA mensajero (mRNA) en un proceso conocido como transcripción. El mRNA es entonces usado por la célula para dirigir la síntesis de proteínas en un proceso conocido como traducción.

Existen importantes distinciones en la estructura de los mRNA de organismos eucariotes que incluyen la presencia del ácido 7-metil-guanílico también llamado "CAP" en su extremo 5',

aspectos de estructura secundaria y terciaria, codón de iniciación (casi siempre AUG), secuencias vecinas al codón de iniciación (contexto) y la cola de poli A al extremo 3'.

El RNA de transferencia se usa para construir la secuencia correcta de la proteína que refleja la información almacenada en el mRNA. El tRNA tiene en una parte de su molécula un triplete de bases, conocido como anticodón, que reconoce y se une por complementariedad a tres bases en la molécula del mRNA. En el extremo opuesto del anticodón se encuentra una región donde el tRNA se une a un aminoácido. Hay por lo menos 20 especies de moléculas de tRNA en cada célula correspondiendo cuando menos una (y a menudo varias) a cada uno de los 20 aminoácidos necesarios para la síntesis de proteínas.

Cuando el tRNA tiene unido un aminoácido se le conoce como aminoacil tRNA. La unión del aminoácido al tRNA requiere de la participación de una enzima específica para cada uno de los 20 aminoácidos. A estas enzimas se les conoce como aminoacil-tRNA sintetetasas.

En la síntesis de proteínas se pueden diferenciar tres etapas que son iniciación, alargamiento y terminación. Se requiere de diversos factores de naturaleza peptídica para las diferentes etapas. Para los eucariotes los factores de iniciación se abrevian "eIF", los de elongación "eEF" y el de terminación "eRF" (su papel se menciona adelante).

La síntesis de proteínas se lleva a cabo en los ribosomas, que son organelos localizados en el citoplasma celular. Un ribosoma consta de 2 subunidades, la mayor con un peso de 50S en organismos procariotes y 60S en eucariotes ( el término "S" se refiere al tamaño que se determina por la velocidad de sedimentación medida en unidades Svedberg). La subunidad pequeña tiene un peso de 30S en procariotes y 40S en eucariotes. El ribosoma completo pesa 70S y 80S para procariotes y eucariotes respectivamente. Ambas subunidades están formadas por RNA ribosomal (rRNA) y por proteínas. (Ver Figura 1).

Cada ribosoma tiene dos sitios adyacentes para unir RNAt. Al sitio A se une el aminoacil-tRNA; el sitio P se une al tRNA que tiene la cadena polipeptídica en formación.



**SITIOS ACTIVOS EN EL RIBOSOMA:** El ribosoma posee un buen número de sitios activos, cada uno de los cuales está constituido por un grupo particular de proteínas asociadas a una región del rRNA. Los centros activos requieren de la participación directa del rRNA, ya sea a un nivel estructural o incluso catalítico. Ninguna de las actividades catalíticas puede ser reproducida por una proteína aislada o por un grupo de ellas. De manera que se piensa en el ribosoma como una estructura interactiva, en donde los cambios en la conformación de un sitio modifican la función de otro.

Entre los sitios que se pueden distinguir se cuentan:

- 1.- El sitio de unión donde la subunidad 40s une al complejo mRNA·Met-t<sub>i</sub>RNA·eIF-2·GTP.
- 2.- Los sitios A y P de el ribosoma 80s.
- 3.- El centro con actividad de peptidil transferasa de la subunidad 60s.
- 4.- El sitio de unión de eEF-2 responsable de la translocación, también en la subunidad grande.

Los sitios donde se unen los diversos elementos en la síntesis de proteínas son amplios y ocupan hasta 2/3 partes del ribosoma. A esta parte del ribosoma se le conoce como dominio de traducción, mientras que al resto del ribosoma se le conoce como dominio de salida; los ribosomas que están unidos a membranas están conectados por este dominio (Lewin, 1994, figura 2).

Se han identificado otros sitios en **organismos procariotes** y es posible que en eucariotes se encuentren sitios análogos:

- 1.-La unión inicial de la subunidad 30S requiere de la proteína S1 (en este caso S significa proteína de la subunidad pequeña del ribosoma por la palabra en inglés "small"), que tiene una afinidad muy fuerte por ácidos nucleicos. Es responsable de mantener al mRNA en la forma de una sola cadena mientras se encuentra unido a la subunidad 30S. La proteína S1 junto con la S18 y la S21 constituyen un dominio involucrado tanto en la unión inicial del RNAm, como del tRNA iniciador (Lewin, 1994).

2.- Otro sitio es el formado en la protuberancia exterior de la subunidad grande. En este sitio se encuentran dos dímeros formados por las proteínas L7/L12 (aquí la L significa proteína de la subunidad grande del ribosoma, por la palabra en inglés "large") que son las únicas que se encuentran en más de una copia por ribosoma y son de naturaleza ácida. Cuando ambos dímeros son removidos, las partículas ribosomales se vuelven incapaces de llevar a cabo la hidrólisis de GTP a la demanda de cualquier factor accesorio. Sin embargo, no se considera que la actividad de GTPasa recaiga en estas proteínas aunque pueden ser necesarias para la actividad de otra proteína (Lewin, 1994).

3.- El factor EF-G (homólogo del eEF-2 de eucariotes) se une a la subunidad 50S cerca de la proteína S12, una de las proteínas del sitio de unión del mRNA en la subunidad 30S. Esto coloca a EF-G en la interface entre las subunidades en la vecindad de los dímeros L7/L12.

Existen dos niveles donde la síntesis de proteínas puede ser regulada y que son los procesos de traducción y transcripción. El control a nivel de transcripción y procesamiento del mRNA tarda al menos unos quince minutos, pero los diferentes mecanismos de control a nivel traduccional pueden ser mucho más rápidos. Aún cuando ambos procesos son similares, en eucariotes y procariotes existen diferencias importantes entre ellos.

## **SINTESIS DE PROTEINAS EN EUCARIOTES**

Una vez que el RNA ha sido procesado en el núcleo de la célula eucariote para producir el mRNA maduro, éste se transporta al citoplasma y se utiliza para la formación de nuevas proteínas, entra al ribosoma y su secuencia es interpretada (decodificada) para dar lugar a una cadena de aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos (proteína).

Como se dijo anteriormente, el proceso de la síntesis de proteínas puede describirse en tres fases: iniciación, alargamiento y terminación.

La iniciación involucra las reacciones que preceden a la formación del enlace peptídico entre los primeros dos aminoácidos de la proteína. Es el paso más lento y puede ser el limitante para determinar la velocidad a la que un mRNA es traducido.

La elongación involucra a todas las reacciones de síntesis a partir del primer enlace peptídico hasta la adición del último aminoácido.

La fase de terminación comprende los pasos necesarios para liberar a la cadena polipeptídica del ribosoma (figura 3).

**INICIACION.-** Para la fase de iniciación deben llevarse a cabo los siguientes pasos:

- 1) La disociación de los ribosomas en las subunidades 40S y 60S.
- 2) La activación del primer aminoácido (metionina) y la unión del metionil tRNA (met-RNAt ; ) a la subunidad 40S para formar el complejo de preiniciación 43S.
- 3) La unión del RNAm al complejo de preiniciación 43S donde se identifica el codón iniciador y se forma el complejo de iniciación 43S.
- 4) La unión de éste último a la subunidad 60s para formar el complejo de iniciación 80s.

Estas reacciones requieren cuando menos 10 factores de iniciación (eIF), que son los que permiten regular esta parte del proceso.

1.- Disociación de los ribosomas: a concentraciones fisiológicas de  $Mg^{+2}$  (1mM) los ribosomas 80S predominan en un equilibrio activo con sus subunidades disociadas. Los factores de iniciación eIF-1A y eIF-3 desplazan el equilibrio de la disociación al unirse a la subunidad 40S y prevenir su unión con la 60S (Goumans et al., 1980). El factor eIF-6 también impide la unión de las dos subunidades, pero actúa en la subunidad 60S (Lewin, 1994).

2.- Unión del Met-t;RNA : El primer RNA de transferencia que se une a la partícula 40S es de un tipo especial, ya que es el único que puede ser usado para la iniciación. Este tRNA reconoce al triplete AUG que usualmente es el primer codón en ser traducido en eucariotes (aunque también se llega a utilizar GUG) y el aminoácido que carga es una metionina (que a diferencia de procariones no está formilada) y para diferenciarlo del tRNA que lleva la metionina para la elongación se pone subíndice "i" (Lewin, 1994). El factor eIF-2 forma un

complejo con GTP y después se une al met-t<sub>3</sub>RNA para formar un complejo ternario (Benne et al., 1979; Konieczny & Safer, 1983). Este complejo finalmente se une a la partícula 40S para formar el complejo 43S de preiniciación. Estos complejos son estabilizados por el eIF-3 y el eIF-1A (Trachsel et al., 1977; Benne et al., 1978, figura 4).

3.- Unión al mRNA: El complejo de preiniciación se une a un mRNA, el cual se encuentra en forma de partícula ribonucleoprotéica (mRNP) o formando parte de un polisoma, por medio del término 5' del mRNA y rastrea hasta que encuentra la señal de iniciación (modelo de rastreo (Kozak, 1989 A). La formación del complejo de iniciación 43S es promovida por la hidrólisis de ATP y un cierto número de factores. Entre estos factores está el eIF-4F que se une al CAP del mRNA a través de su subunidad  $\alpha$  (eIF-4E). El eIF-4A y eIF-4B se unen también al mRNA en la zona del CAP. Los factores 4A y 4B tienen una actividad de RNA helicasa dependiente de ATP, que probablemente es la responsable del desdoblamiento de la estructura secundaria del mRNA en el extremo 5' (Ray et al., 1985; Lawson et al., 1989; Rozen et al., 1990).

Después que estos factores se han unido al mRNA, permiten que éste último pueda unirse al complejo de preiniciación. Debido a que el eIF-3 se une tanto al mRNA como a el complejo de preiniciación y a los factores eIF-4F y eIF-4B puede considerarse como la llave de unión entre el complejo de preiniciación y el RNAm para formar el complejo de iniciación (Duncan et al., 1987; Etchison & Smith, 1990).

Después del reconocimiento del CAP por los factores de iniciación y la unión del mRNA a el complejo de preiniciación, empieza el rastreo hasta el codón de iniciación para formar el complejo de iniciación 43S. (Figura 5).

4) Formación del complejo de iniciación 80S: En este paso la subunidad 60S se une al complejo de iniciación 43S, esta reacción requiere la función del factor eIF-5 y la hidrólisis de la molécula de GTP unida a eIF-2 presente en el complejo 43S. La reacción de GTPasa

es promovida por **eIF-5** en ausencia de la subunidad 60S y provoca la salida del complejo **eIF-2·GDP** y de otros factores también unidos como **eIF-1A** y **eIF-3** (Benne & Hershey, 1978; Peterson et al., 1979; Raychaudhuri et al., 1985) del ribosoma. La unión subsecuente de la subunidad 60S debe ser rápida debido a que la estabilidad del Met-t<sub>3</sub>RNA unido a la subunidad 43S en ausencia de **eIF-2** es baja.

El complejo **eIF-2·GDP** intercambia **GDP** por **GTP** y este proceso es catalizado por el factor **eIF-2B** también llamado **GEF** (guanine exchange factor) (Rowlands et al., 1988; Dholakia & Wahba, 1989).

Una vez que se ha formado el complejo de iniciación 80S, el Met-t<sub>3</sub>RNA queda unido al sitio P del ribosoma, el que se encuentra listo para continuar con la fase de elongación. (Figura 6).

**ELONGACION.-** Este es un proceso cíclico que añade un aminoácido al carboxilo terminal del péptido naciente por turno del ciclo. Es promovido por cuatro factores de elongación (eEF) e involucra 4 pasos principales (Figura 7):

1) La unión de un aminoacil-tRNA al sitio A del ribosoma, catalizado por **eEF-1 $\alpha$** .

Un aminoacil-tRNA forma un complejo ternario con **eEF-1 $\alpha$**  y con **GTP** antes de unirse al sitio A del ribosoma. En estos momentos el sitio P se encuentra ocupado por el aminoacil t<sub>3</sub>RNA.

2) Hidrólisis de **GTP** y salida del complejo **eEF-1 $\alpha$ ·GDP** del ribosoma.

Después de la unión del complejo al ribosoma pero antes de la formación del enlace peptídico, el **GTP** es hidrolizado y se libera el complejo **eEF-1 $\alpha$ ·GDP** fuera del ribosoma (Thompson, 1988). Apparently este es el paso limitante de la elongación (por lo menos en bacterias). Como su contraparte en la iniciación (**eIF-2·GDP**), el recambio del **GDP** del complejo liberado requiere la presencia catalítica de un factor proteínico en este caso **eEF-1 $\beta$**  (Janssen & Moller, 1988).

3) Formación del enlace peptídico catalizado por el centro con actividad de peptidil transferasa en la subunidad 60S.

Durante la formación del enlace peptídico se transfiere el aminoácido inicial (o en su caso el péptido) unido al tRNA en el sitio P hacia el aminoacil-RNAt presente en el sitio A. La actividad responsable para la formación del enlace es llamada peptidil transferasa. Esta actividad se encuentra en la subunidad grande del ribosoma, y si bien son necesarias las proteínas, aparentemente la actividad catalítica es propiedad del rRNA más que de alguna proteína en particular (Lewin, 1994). Aparentemente el factor **eEF-5A** promueve la formación del primer enlace peptídico.

4) La translocación promovida por **eEF-2**.

El ciclo de adición de aminoácidos es completado por el proceso de translocación en donde el ribosoma avanza tres nucleótidos a lo largo del mRNA en dirección 5' a 3'. El resultado es la expulsión del tRNA descargado del sitio P, para que el nuevo peptidil-RNAt pueda entrar lo que a su vez ocasiona que el sitio A quede libre para la entrada del aminoacil-tRNA correspondiente al siguiente codón. La actividad de translocasa la da el factor **eEF-2** que es dependiente de GTP.

Durante cada ciclo se consume una cantidad de energía considerable, al menos se usan dos enlaces de alta energía (en forma de GTP) en cada paso de unión y de translocación. También se utilizan dos enlaces de alta energía (en forma de ATP) para cargar cada tRNA con un aminoácido.

Este proceso es rápido ya que un ribosoma eucariote puede añadir de 2 a 6 aminoácidos por segundo, aunque no tan rápido como las bacterias que pueden incorporar entre 15 y 18 residuos de aminoácido por segundo. Cualquier aminoacil-tRNA, excepto el iniciador, puede entrar al sitio A (Lewin, 1994).

**TERMINACION.-** Esta parte del proceso es poco conocida; cuando un codón de terminación llega al sitio A del ribosoma el factor de liberación **eRF** promueve el rompimiento del peptidil-tRNA completado liberando la proteína formada. Los codones de

terminación son UAG, UAA, UGA. Se necesita GTP en los eucariotes para que eRF se una al ribosoma (Lewin, 1994).

### **MECANISMOS DE CONTROL EN LA SINTESIS DE PROTEINAS:**

I) Estructura y concentración del RNAm: La cantidad de mRNA dentro de la célula eucariote está determinada por el grado de síntesis (transcripción), la eficiencia del procesamiento transcripcional, el transporte fuera del núcleo y su velocidad de degradación en el citoplasma. Pero en células eucariotes, en términos de síntesis global de proteínas, el mRNA no parece ser limitante.

Sin embargo, se sabe que existen 4 características que afectan la eficiencia de traducción de un mRNA.

a) La presencia y accesibilidad de la estructura 7-metil guanosina trifosfato en el extremo 5' (5'-m<sup>7</sup>G) que promueve la traducción del mRNA. Casi todos los mRNA de mamífero la poseen.

b) Las estructuras secundarias y terciarias juegan un papel importante en el proceso de decodificación del mRNA dependiendo de su grado de estabilidad y posición en la cadena. La estructura secundaria en el extremo 5'-UTR puede afectar la accesibilidad al CAP y/o al sitio de iniciación y puede impedir el rastreo de la subunidad 40s. Sin embargo, estructuras secundarias presentes en la región codificadora no parecen interferir de manera importante con el proceso de elongación.

c) El sitio en que se encuentra el codón AUG iniciador y las secuencias vecinas a éste (contexto). Se ha demostrado que el anticodón del Met-RNAt interactúa con la señal de iniciación (AUG) del mRNA durante la formación del complejo de preiniciación (Kozak, 1989 B) y que el contexto del AUG facilita o disminuye esta interacción. Elementos que dan un contexto fuerte y que facilitan la interacción entre el AUG iniciador y el anticodón del Met-RNAt incluyen a purinas en las posiciones -3 y +4 (donde A del codón AUG está en la

posición +1). Cuando existe un contexto débil es posible que el complejo 43S pase sobre el codón AUG y no se detenga para empezar la síntesis de proteína.

d) La presencia de una cola de poli(A) en el extremo 3' ayuda a aumentar la eficiencia de la traducción. Estos mRNA tienen colas de 200 a 250 residuos adenilados cuando son transportados al citoplasma.

II) Fosforilación: El proceso de fosforilación/desfosforilación de numerosas proteínas del aparato de traducción es importante en el control de la síntesis total de proteínas. Se han identificado varias fosfoproteínas en células de mamífero: por lo menos 13 en factores de iniciación, 3 de los 4 factores de elongación, 3 proteínas ribosomales y varias aminoacil-RNAt sintetasas (Hershey, 1989). En algunos casos la fosforilación causa inhibición de la traducción y en otros la estimula.

Estimulación de la síntesis de proteínas: La fosforilación de los factores de iniciación **eIF-2B** (Dholakia & Wahba, 1989), **eIF-3** (Milburn et al., 1990), **eEF-4B** (Duncan & Hershey, 1984; 1987) y **eEF-4F** (Tuazon et al., 1989; Morley & Traugh, 1989; Tuazon et al., 1990), así como la de la proteína ribosomal S6 están relacionados con la activación de la síntesis de proteína in vivo.

Represión de la traducción: Esta es observada en células animales carentes de suero, aminoácidos o sujetas a estrés por calor u otras condiciones. También la inhibición de la síntesis es promovida por la fosforilación de otros dos factores solubles: **eIF-2** (Farrell et al., 1977) y **eEF-2** (Ryazanov, 1987; Nairn & Palfrey, 1987).

### III) Otros mecanismos:

El control global de la síntesis de proteínas es importante ya que coordina la traducción del mRNA con el metabolismo general de la célula, mientras que la regulación de un solo tipo de mRNA se emplea para dar control temporal a la expresión de un gene en particular. Ejemplo de esto último es el hecho de que algunas proteínas al llegar a una concentración crítica en la célula se unen a su mRNA e inhiben su propia síntesis (Gold, 1988).



También se han observado controles globales ocasionados por el pH intracelular y por los niveles de  $Ca^{2+}$  (Brostrom & Brostrom, 1990). La síntesis de proteínas también puede ser afectada por metales pesados (Pain & Clemens, 1991), mientras que los choques hipertónicos inhiben la síntesis de proteínas a nivel de iniciación (Saborio et al, 1974). Las hormonas afectan este proceso (de síntesis) a través de procesos de fosforilación/desfosforilación (Schneider & Shenk, 1987), aunque otros mecanismos puedan ocurrir.

Los RNAs citoplásmicos pequeños pueden llegar a inhibir la traducción en algunos casos, debido a interacciones complementarias (van der Krol et al., 1989).

También se sabe que el proceso de degradación de algunos RNAm está acoplado al proceso de traducción, como ocurre en el sistema de la tubulina (Gay et al., 1989) donde la traducción del RNAm es necesaria para su degradación vía un mecanismo que reconoce al producto polipeptídico naciente.

### **FUNCION DE LAS PROTEINAS ACIDAS DEL RIBOSOMA (PRAs)**

Los ribosomas contienen, entre varias proteínas básicas, un juego de proteínas muy ácidas y altamente conservadas que adicionalmente son las únicas presentes en más de una copia por ribosoma. A estas proteínas se les conoce como proteínas A (ácidas) o proteínas P (forma fosforilada en eucariotes); nosotros las llamaremos proteínas ribosomales ácidas (PRAs). Estas proteínas (PRAs) han llamado la atención porque se han encontrado anticuerpos contra ellas en un alto porcentaje de individuos con ciertas enfermedades autoinmunes. También se ha encontrado que en algunas especies son importantes o esenciales para la síntesis de proteínas y por consiguiente para la vida.

Uno de los rasgos estructurales mejor conocidos de la subunidad larga del ribosoma bacteriano es una protuberancia lateral compuesta por dos dímeros de las proteínas L7 y L12 (PRAs). Esta protrusión es altamente flexible (Gudkov et al., 1982) y posiblemente se puede plegar sobre el cuerpo de la partícula subribosomal (Traut et al., 1983).

La proteína L7 es la forma N-acetilada de la segunda (Brot & Weissbach, 1981). Estas proteínas tienen la característica de ser las únicas de naturaleza ácida (pH 3 a 5) y encontrarse en más de una copia por ribosoma, en contraste con el resto de las proteínas ribosomales que son básicas y están en una sola copia. También tienen una composición de aminoácidos hidrofóbica (20% alanina)(Matheson et al., 1980).

El complejo L7/L12 interacciona con factores de la traducción de proteínas, algunos de los cuales unen e hidrolizan GTP, incluyendo al factor de iniciación IF2, factores de elongación EF-Tu y EF-G (contrapartes de los eucariotes eEF-1 y eEF-2) y factores de liberación RF1 y RF2; L7/L12 también son necesarias para unir esos factores y el aminoacil-tRNA al ribosoma (Weissbach, 1980; Brot & Weissbach, 1981). Los análogos eucariotes de estas proteínas, llamadas P1 y P2, también tienen esta función: se requieren para la unión del aminoacil-tRNA, para la actividad de GTPasa de eEF-2, interactúan con eEF-1 y son necesarias para la síntesis de proteínas (MacConnell & Kaplan, 1980; 1982; Sanchez-Madrid et al., 1979).

Un sistema para su purificación utiliza las características fisicoquímicas de las PRAs. Estas pueden ser fácilmente disociadas del ribosoma mediante un tratamiento alto en sales y etanol al 50%; las PRAs permanecen solubles mientras el remanente de los ribosomas o subunidades precipita (Hamel et al., 1972). Esto provee de un método uniforme para el aislamiento y caracterización de estas proteínas de distintas fuentes. Desde la detección de L7 y L12 se han buscado en un buen número de organismos y es un hecho universal la existencia en los ribosomas de estas proteínas ácidas o sus equivalentes en células de organismos pertenecientes a todos los reinos biológicos, desde arqueobacterias hasta eucariotes. En células eucariotes las PRAs parecen ser funcionalmente equivalentes a sus contrapartes bacterianas (Hamel et al., 1972; van Agthoven et al., 1978; Laverge et al., 1987) y además se ha reportado un intercambio funcional entre proteínas de ambos orígenes. A partir del hecho de que la función de los ribosomas en eucariotes y procariotes es similar, se supuso que ciertos componentes de origen procarionte podrían llevar a cabo las funciones en

ribosomas eucariotes y viceversa. En levadura, Ballesta y sus colaboradores (Sanchez-Madrid et al., 1981) obtuvieron partículas ribosomales sin las proteínas ácidas L44/L45 (contrapartes eucariotas de L7 y L12 y que actualmente se llaman YP2 $\alpha$  y YP2 $\beta$  (Santos et al., 1993)), estas partículas no podían unir eEF-2 y tampoco podían llevar a cabo la hidrólisis de GTP promovida por este factor durante la elongación; sin embargo, al agregarles las proteínas procariotas L7 y L12 se vió que se formaba el complejo ribosoma-eEF-2-GTP pero no se llevaba a cabo todavía la hidrólisis del GTP. Se observó que si además se quitaban las proteínas ribosomales L15 y S31, el eEF-2 se podía unir y se podía llevar a cabo la hidrólisis de GTP. Esto último podría ser debido a que L15 y S31 afectaban la interacción de L7/L12. También se hicieron intercambios funcionales de L7/L12 en células de hígado de rata (Stöffler et al., 1974) y en *Artemia salina* (Müller et al., 1975) con éxito.

Si bien la estructura de estas proteínas se ha conservado (Shimmin et al., 1989) durante la evolución, las de eucariotes adquirieron estructura y función peculiares que sugieren que llevan a cabo papeles regulatorios adicionales en la síntesis de proteínas. Entre las características que hacen únicas a las PRAs de eucariotes están:

1.- Se encuentran fosforiladas en el ribosoma (Zinker & Warner, 1976; Sanchez-Madrid et al., 1981). En todas las células procariotes en las que se ha buscado, no se ha encontrado ninguna proteína ribosomal fosforilada (Wittman, 1974) en condiciones normales, mientras que en eucariotes las PRAs pueden estar monofosforiladas como en levadura (Juan-Vidales et al., 1984) o multifosforiladas como en hígado de rata (Reyes et al., 1977).

2.- Algunos investigadores (Zinker, 1980; Sacaz-Robles et al., 1990) demostraron que existe una poza de estas proteínas desfosforiladas en el citoplasma. La base de esta demostración proviene de estudios en cultivos de levadura marcados con  $^{32}\text{P}$ i y con aminoácidos tritiados. Después de inmunoprecipitar las PRAs del citoplasma se encontró que no había incorporación de  $^{32}\text{P}$ i pero sí una gran incorporación de tritio. Esto quiere decir que hubo síntesis de estas proteínas, pero las que se encontraban en el citoplasma no estaban fosforiladas.

3.- Existe un intercambio entre las proteínas de la poza y las del ribosoma durante la síntesis de proteínas (Tsurugi & Ogata, 1985). Zinker y Warner (1976) supusieron que las proteínas ácidas de levadura eran necesarias para la hidrólisis del GTP durante la fase de elongación y que eran aceptores del Pi que resultaba de dicha hidrólisis, de manera que se tenían que recambiar cada vez que se necesitaba hacer una translocación de la cadena polipeptídica del sitio P al sitio A.

4.- La cantidad de PRAs unidas al ribosoma parece estar relacionada con la actividad de la partícula. Ballesta y colaboradores (Saenz-Robles et al., 1990) encontraron que las células de levadura en crecimiento exponencial tenían 4 de estas proteínas por ribosoma, mientras que las células en fase de envejecimiento o estacionario tenían solamente 2.

5.- La fosforilación de las PRAs se requiere para la actividad del ribosoma tanto *in vivo* (Naranda & Ballesta, 1991) como *in vitro* (MacConnell & Kaplan, 1982; Lavergne et al., 1987). Zinker y Warner (1976) observaron que la fosforilación de estas proteínas no se inhibía o disminuía cuando se producía disminución de la síntesis de ribosomas en células de levadura, pero sí disminuye si se detiene la síntesis de proteínas. Por su parte Ballesta y colaboradores (Juan-Vidales et al., 1984) demostraron que un extracto de estas proteínas (PRAs) permitía unir eEF-2-GTP a un ribosoma depletado de ellas, pero si el mismo extracto era tratado con fosfatasa no se llevaba a cabo esta unión de eEF-2-GTP. También demostró marcando a las PRAs radiactivamente con yodo que al estar desfosforiladas disminuye notablemente su afinidad por el ribosoma.

6.- Los 10 aminoácidos del carboxilo terminal de las PRAs están totalmente conservados en casi todas las especies estudiadas (Shimmin et al., 1989).

En los ribosomas eucariotes existe una familia de proteínas ácidas que son codificadas por diferentes genes. Dos tipos de polipéptidos se encuentran en mamíferos y se les ha nombrado P1 y P2 (Wool et al., 1991). En eucariotes inferiores se llegan a encontrar más de

dos polipéptidos, pero todos se pueden agrupar en dos juegos según su parecido a P1 y P2 de mamífero. Se sabe que el amino terminal de P1 está acetilado, no así el de P2.

También se ha encontrado otra proteína similar pero con un peso mayor y que se le ha dado el nombre de P0 (Towbin et al., 1982).

En humanos se han caracterizado estas proteínas y se ha encontrado que P0, P1 y P2 comparten los 17 aminoácidos del carboxilo terminal y la secuencia es **KEESEESD(D/E)DMGFGLFD-COOH** (Rich & Steitz, 1987). Se sabe que esta secuencia es la base de su reactividad inmunológica en sueros de pacientes con lupus eritematoso sistémico (Elkon et al., 1986), mal de Chagas con complicaciones cardíacas (Mesri et al., 1990) y leishmaniasis (Soto et al., 1993). La longitud del RNAm obtenido es de 1200, 650 y 600 bases para P0, P1 y P2 respectivamente, mientras que la masa molecular de las proteínas es de 37, 15 y 14 Kd en el mismo orden (Rich & Steitz, 1987). Aparentemente P0 es la contraparte eucariote de L10.

En levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) se han estudiado en forma abundante estas proteínas y se han detectado y clonado 4 genes (Mitsui & Tsurugi, 1988; Remacha et al., 1988; Newton et al., 1990) que dan lugar a 4 polipéptidos diferentes (también se encuentran sus formas acetiladas y fosforiladas) nombrados YP1 $\alpha$  y YP1 $\beta$ , que corresponderían a la familia P1, y YP2 $\alpha$  y YP2 $\beta$  que corresponderían a la familia P2. También se sabe que cualquiera de estas proteínas puede ser eliminada en *S. cerevisiae* sin afectar seriamente el tiempo de generación de las células, no así si se elimina por completo un juego, ya sea de P1 o de P2 (Remacha et al., 1992).

También en levaduras se ha encontrado una proteína a la que se le ha dado el nombre de P0 debido a su peso y a su semejanza inmunológica con P0 de mamífero. Esta proteína es requerida para la actividad ribosomal y para la viabilidad de las células (Santos & Ballera, 1994), ya que células mutantes de *S. cerevisiae* crecidas en condiciones que reprimían la expresión de ésta proteína reducían la velocidad de su crecimiento hasta llegar a una morfología aberrante y finalmente la muerte. También durante este proceso se observó una

dramática reducción de polisomas en extractos celulares y la aparición de subpartículas 40S en los polisomas restantes indicando que existía un déficit en la cantidad disponible de la subunidad 60S.

Se ha pensado que se puede formar el complejo  $(P1)_2 \cdot P0 \cdot (P2)_2$  (Santos & Ballesta, 1994), que es equivalente al pentámero formado en bacterias  $(L7/L12)_4 \cdot L10$  (Uchiumi & Komiami, 1992); sin embargo el hecho de que se necesite P0 y solo P1 o P2 para la viabilidad celular indica que podría tener otro papel en el ribosoma.

P0 no se acumula en el citoplasma ni siquiera en condiciones que dan lugar a una acumulación significativa de su RNAm. Es posible que el exceso de proteína se degrade como sucede con el resto de proteínas ribosomales (Warner, 1989), pero también es posible que se una a alguna estructura celular insoluble; con relación a esto es interesante hacer notar que se han encontrado determinantes antigénicas de P0 en membranas celulares de extractos de levadura (Koren et al., 1992).

Se sabe que las células eucariotes pueden detectar y eliminar a aquellas proteínas ribosomales que no están unidas al ribosoma (Warner et al., 1985); las PRAs son las únicas que eluden este mecanismo (con excepción de P0); sin embargo, una mutación cerca del amino terminal las hace sensible a la degradación (Naranda et al., 1988).

Se han estudiado las regiones 5' de los UTRs y una delección de 69 bases resulta en una eficiencia en la traducción de YP2 $\beta$ , con lo que se acumula la proteína, mientras que la traducción de YP1 $\beta$  se ve seriamente reprimida. Además, la sobreexpresión de YP2 $\beta$  inhibe la síntesis de proteínas a nivel de iniciación afectando la interacción de la subunidad 60s con el complejo de iniciación 43s (Bermejo et al., 1993). En el mismo artículo se demostró que existe un efecto opuesto de la expresión de estos dos polipéptidos, pues mientras YP1 $\beta$  parece reprimir la expresión de YP2 $\beta$ , esta última se requiere para estimular la expresión de YP1 $\beta$ . Es probable que esta regulación mutua trabaje a nivel de traducción y que pueda ser independiente del resto de los componentes ribosomales (Bermejo et al., 1993).

En plantas casi no se han reportado estudios de estas proteínas, sin embargo en nuestro laboratorio se han extraído PRAs a partir de ejes embrionarios incubados a diferentes intervalos de tiempo habiendo usado columnas de carboximetilcelulosa (Pérez-Méndez et al., 1993). El peso de los péptidos encontrados fue de 15, 16 y 37 kD, con un punto isoelectrico de 4.7 a 4.9 y también se encontró que estos ejes incorporan  $^{32}\text{P}$  en los residuos de serina y de treonina. En cuanto a la regulación de estas proteínas durante la germinación no se tenían datos, aunque se había encontrado (Sánchez de Jiménez et al., 1981) que ejes embrionarios pretratados con  $\alpha$ -amanitina expresaban diferentes proteínas en el transcurso de la germinación, lo que nos hablaría de una regulación a nivel traduccional de ellas. Más recientemente (Ibarra, 1990) en nuestro laboratorio, se encontró en un sistema *in vitro* formado con ribosomas provenientes de maíz y mensajes exógenos (virus del tabaco) que existía cierta diferencia en la selectividad de traducción de los ribosomas al ser tratados con auxinas cuando el patrón de proteínas se comparaba con los que no eran tratados con estas hormonas. Esto aportó mayor evidencia de la existencia de un sistema de selección de mensajes o de acoplamiento diferencial de los mensajes con los ribosomas. Con todo esto supusimos la siguiente hipótesis de trabajo:

**Hipótesis:** La expresión de las PRAs se regula a nivel traduccional durante el proceso de germinación de la semilla.

Y se plantearon los siguientes objetivos generales:

- 1) Determinar la presencia de estas proteínas en ejes embrionarios de maíz seco.
- 2) Determinar la presencia del(os) RNAm de estas proteínas en ejes embrionarios de maíz seco.
- 3) Monitorear la expresión de las PRAs durante las 24 horas de germinación.

### III.- METODOLOGIAS

#### 1.- Preparación del material biológico (Sánchez de Jiménez & Aguilar, 1984).

Ejes de maíz: Se utilizaron semillas de maíz (*Zea mays* L) variedad Chalqueño.

Para los experimentos de identificación de proteínas ribosomales ácidas se extrajeron manualmente los ejes embrionarios de semillas maduras y secas. Se pusieron lotes de 700 mg de ejes secos durante 1 hora en 1.3 ml de agua y se incubaron en hielo (esto como control porque otros se tratarían con  $\alpha$ -amanitina). Posteriormente se eliminó el agua y se les agregó 1.3 ml de medio MSI sin hormonas (ver apéndice). Se evitó el sumergirlos por completo y se germinaron en una incubadora con temperatura controlada a 25°C durante el tiempo requerido (3, 6 y 24 horas).

**Síntesis *in vivo*** de proteínas. Algunos ejes se usaron para llevar a cabo síntesis de proteínas *in vivo* para lo cuál se siguió el procedimiento anterior de incubación, pero 3 horas antes de que concluyera se agregaron 400 $\mu$ Curies de metionina <sup>35</sup>S. Hay que hacer notar que los ejes de tres horas de germinación se incubaron desde el principio con la marca. Transcurrido el tiempo de incubación, a cada lote se le quitó el medio y los ejes fueron enjuagados para quitar la marca en exceso. Después de este punto se congelaron a -70°C para trabajar con todas las muestras al mismo tiempo. De estos ejes se extrajeron proteínas ribosomales totales y citoplásmicas (ver adelante) las que se analizaron por electroforesis y se sometieron a autoradiografía en unos casos y en otros se midió la incorporación de marca en el extracto en un contador de centelleo.

Algunos lotes de ejes se sometieron a un tratamiento con  $\alpha$ -amanitina para inhibir la transcripción de mRNA desde el inicio de la germinación. Para lograr esto se sumergieron en 1.3 ml de solución acuosa conteniendo 12  $\mu$ g/ml de este inhibidor en hielo durante 1 hora previa a la germinación. Posteriormente se incubaron en 1.3 ml de medio MSI durante 3, 6 y 24 horas. Otros lotes con este tratamiento se utilizaron para obtener RNA de 24 horas de germinación.

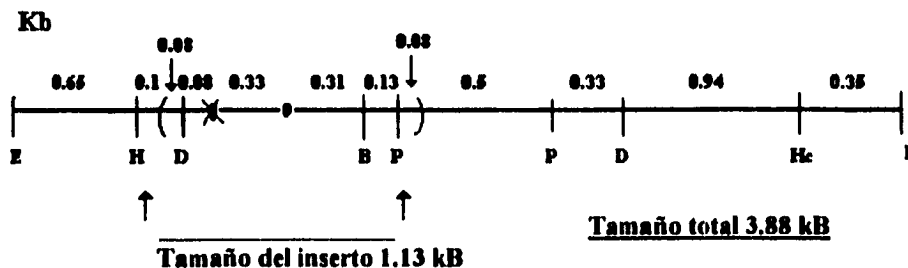


Para los experimentos de identificación del mRNA de las proteínas ribosomales ácidas, el RNA se extrajo siguiendo el protocolo correspondiente (ver adelante). Para este propósito, ejes embrionarios secos o provenientes de semillas previamente incubadas en palanganas cubiertas con papel aluminio en una incubadora con temperatura controlada a 25°C durante el tiempo requerido (0, 3, 6, 9, 24 y 50 horas de germinación), fueron seccionados de las semillas usando guantes estériles.

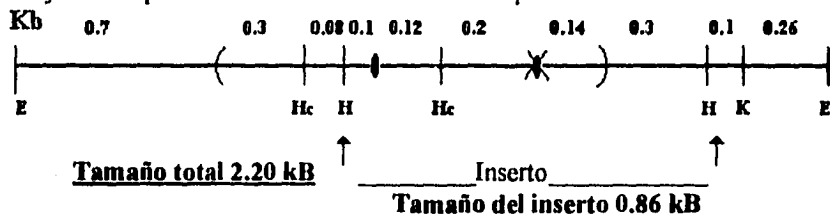
Levadura: Se utilizó levadura silvestre (*Saccharomyces cerevisiae*) para extraer el RNA que se usó como control en los experimentos de Northern blot. Para esto se hizo un cultivo de levadura silvestre en medio YEPD líquido (extracto de levadura 0.5%; peptona 1%; glucosa 1%) incubando con agitación toda la noche a temperatura ambiente. Las células se cosecharon a las 18 horas de cultivo.

Escherichia coli: Se usaron dos cepas de esta bacteria cada una teniendo un plásmido diferente. Una cepa tenía el plásmido PVR45 (donada por el Dr. Samuel Zinker del CINVESTAV) y dentro del plásmido se encontraba un inserto con el gene para la proteína ácida de levadura YP2. El otro tenía el plásmido PMRE44 (donada por el Dr. Juan Ballesta de la Universidad Autónoma de Madrid, en España), dentro de éste plásmido se encontraba un inserto con el mismo gene para la proteína ácida de levadura YP2. A continuación se muestran los mapas de restricción de ambos plásmidos con su respectivo inserto:

Plásmido PVR45 : Las letras indican los sitios de restricción del plásmido y las flechas debajo del mapa de restricción indican los cortes que se hicieron.



**Plásmido PMRE44:** Las letras indican los sitios de restricción del plásmido y las flechas debajo del mapa de restricción indican los cortes que se hicieron.



<u>Símbolo</u>	<u>Significado</u>	<u>Símbolo</u>	<u>Significado</u>
X	TAA	B	Boln II
●	ATG	P	Pst I
E	Eco RI	Hc	Hinc II
H	Hind III	K	Kpn I
D	DroI	( )	Zona Secuenciada

## 2.- Experimentos para obtener a las proteínas ribosomales y citoplásmicas

### Preparación de ribosomas y extracción de proteínas ribosomales (Eberhard & Manfred, 1988).

Se utilizaron ejes embrionarios secos o con alguno de los tratamientos descritos. Estos ejes fueron congelados en nitrógeno líquido y homogenizados en un mortero hasta obtener un polvo fino cuidando de que no se descongelaran. Inmediatamente después se les agregaron 4 volúmenes (5ml) de buffer de extracción (Tris pH 8.2 ácido acético 50 mM; KCl 50 mM; MgAc 5 mM; β-mercaptoetanol 5 mM; sacarosa 250 mM; PMSF 1 mM) y se homogenizó con politrón a intervalos de 30 segundos durante 2 minutos sumergiendo el tubo en hielo a intervalos hasta obtener una pasta blanda. Se centrifugó a 15,000 RPM durante 30 minutos a 4°C (rotor JA-20, 27000g). El sobrenadante se colocó sobre un colchón de sacarosa 1M en buffer de extracción (en una relación de un volumen de colchón de sacarosa por 4 volúmenes de muestra) y se ultracentrifugó a 53,000 RPM durante 3.5 horas. (rotor Beckman 75TI a 200,000g). Se recuperó tanto el precipitado como el sobrenadante posribosomal.

### Tratamiento del precipitado para obtener proteínas ribosomales totales:

El precipitado se colocó en un tubo Eppendorf y se resuspendió en un volumen mínimo (100  $\mu$ l) de buffer A3 (HEPES 20 mM; MgAc 5 mM, KOH 20 mM; KAc 125 mM;  $\beta$ -mercaptoetanol 6 mM). Después se añadió 1/10 del volumen de acetato de Mg 1M manteniendo la muestra en hielo y 2 volúmenes (200  $\mu$ l) de ácido acético glacial (con agitación ocasional) mínimo 1h. La muestra se centrifugó a 3,000 RPM 2 minutos en microfuga. El sobrenadante se precipitó con 3 volúmenes de acetona fría y se dejó reposar toda la noche a -20°C. Al día siguiente se centrifugó a 8,000 RPM 15 minutos a 4 °C en microfuga, se evaporó la acetona por completo con una corriente de aire, y el precipitado finalmente se resuspendió en agua. Con este procedimiento se obtienen proteínas ribosomales totales.

Tratamiento del sobrenadante posribosomal (proteínas citoplásmicas) para obtener proteínas ácidas:

El sobrenadante posribosomal se precipitó añadiendo acetona, 5 volúmenes por 1 volumen de sobrenadante, reposando toda la noche a -20°C. Al día siguiente se centrifugó a 10,000 RPM en el rotor JA-20 (12000g ) durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se decantó y el precipitado se secó con corriente de aire hasta evaporar bien la acetona. Después se agregaron 0.5 ml de buffer de resuspensión (Tris HCl pH 7.4 100 mM; cloruro de magnesio 12 mM; cloruro de potasio 80 mM;  $\beta$ -mercaptoetanol 5 mM) y el precipitado se disolvió bien. Se añadieron 0.5 ml de buffer I (Tris HCl pH 7.4 100 mM; cloruro de magnesio 20 mM; cloruro de amonio 1500 mM;  $\beta$ -mercaptoetanol 3 mM) y la mezcla se agitó durante 20 minutos en hielo. Se añadió un volumen de etanol y la mezcla se agitó durante 5 minutos. A continuación se añadió otro volumen de etanol y la mezcla se agitó otros 5 minutos. Después se centrifugó a 10,000 RPM durante 10 minutos a 4°C (rotor JA-20, 12000g ) y el sobrenadante se precipitó con 2.5 volúmenes de acetona y se centrifugó a 10,000 RPM durante 10 minutos a 4°C (rotor JA-20, 12000g ). Se decantó el sobrenadante y el sedimento se sometió a una corriente de aire hasta evaporar bien la acetona. El precipitado se redisolvió en 0.5 ml de agua (volumen final).

### 3.- Análisis por Western blot (Towbin et al., 1979)

Electroforesis: Se cuantificó la proteína tanto en la fracción ribosomal como en la citoplásmica mediante el método de Bradford (Bradford, 1976) usando una curva estándar de albúmina. Una vez calculada la concentración de proteína se tomaron alícuotas de las fracciones de 20 a 50 µg de proteína y se mezclaron con 2 volúmenes del buffer (amortiguador) de muestra para proteínas ribosomales (Tris HCl pH 6.8 0.05%; SDS 1%; β-mercaptoetanol 1%; EDTA 0.02 M; Glicerol 10 %; azul de bromofenol 0.002%, urea 8 M). El análisis de proteínas se hizo por medio de electroforesis usando la cámara para electroforesis en minigeles (Mighty Small de Hoefer). Se usaron geles desnaturalizantes de acrilamida al 14% de acuerdo a Laemmli (1970) y se corrieron con una intensidad de 20 mA por placa durante 2 horas.

Transferencia: Después de que terminó la electroforesis, las proteínas del gel se transfirieron a una membrana de difluoruro de dipolivinilideno (PVDF) mediante un aparato de transferencia semiseco (LKB, Novablot); para ello se pusieron varias capas de papeles filtro Whatman 3mm antes y después del gel en el siguiente orden:

- ) 3 papeles sumergidos en solución anódica I de transferencia (Tris 0.3 M pH 10.4, 20% de metanol v/v).
- ) 3 papeles sumergidos en solución anódica II de transferencia (Tris 25 mM pH 10.4, 20% de metanol v/v).
- ) La membrana de PVDF (previamente se hidrata metiéndola 3 segundos aproximadamente en etanol y luego 10 minutos en agua desionizada) en solución anódica II.
- ) El gel que también se equilibró en solución anódica II de transferencia.
- ) 3 papeles sumergidos en solución catódica III de transferencia (6-amino-n-hexen caproico 10mM pH 7.2, 20% de metanol v/v).

La transferencia se llevó a cabo en 1 hora a 1mA/cm<sup>2</sup>.

**Observaciones:**

Cuando no es posible transferir inmediatamente el gel se puede dejar toda la noche en solución de transferencia II sin que las proteínas se difundan. Si se utilizó un aparato de electroforesis para geles grandes hay que correrlo con la misma intensidad durante 1 hora y media. La membrana se puede guardar una vez que esté seca. Sin embargo una vez que se ha revelado, el color puede disminuir con el tiempo.

**Revelado de la membrana:** Para realizar el revelado, la membrana de PVDF con las proteínas transferidas se puso en agitación suave en solución de saturación (0.05% v/v Tween 20 , leche descremada 5% disueltos en PBS (NaCl 0.15 M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.8 mM, NaHPO<sub>4</sub> 10.5 mM)) por lo menos 1 hora. Posteriormente se hicieron dos lavados de 15 minutos con agitación leve en PBS. Se sacaron las membranas de la solución de saturación y se incubaron con anticuerpos antiPRAs de levadura\* obtenidos en conejo en solución de saturación a una dilución de trabajo 1:800, durante 2 horas a 37°C o bien toda la noche en refrigeración usando agitación leve. Terminado el tiempo de incubación se hizo un lavado de 15 minutos con PBS, después otro lavado de 15 minutos con PBS en NaCl 1M. Finalmente se hizo otro lavado de 15 minutos con PBS. Enseguida las membranas de PVDF se incubaron 2 horas a temperatura ambiente con los segundos anticuerpos antigama globulina (IgG) de conejo (Sigma No. A-9044, 1:2000) conjugados con la enzima peroxidasa. Después de incubar se hicieron dos lavados de 15 minutos con PBS y se reveló con el sustrato y cromógeno: 22 mg de 4-cloro-naftol, 11 ml de metanol, 33 ml de PBS y 44 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30 %, este reactivo se preparó al momento y en este orden.

Las muestras que son positivas aparecieron como manchas de un color entre gris y morado oscuro.

**Observaciones:** Si la membrana por revelar se encuentra seca se hidrata sumergiéndola unos segundos en metanol (grado R.A) y después diez minutos en agua desionizada.

---

\* Los anticuerpos son contra proteínas ácidas de levadura obtenidos en conejo por la Maestra en Ciencias Mariacelena Mellado.

#### 4) Cuantificación y síntesis de PRAs (Durán et al., 1984; Borgese & Gactani, 1980)

Inmunoprecipitación: Se tomaron 350 µg de proteínas ribosomales y 2500 µg de la fracción citoplásmica de extractos de proteínas ribosomales totales y del sobrenadante citoplásmico provenientes de ejes previamente incubados con y sin un tratamiento de  $\alpha$ -amanitina, como se indicó en el inciso correspondiente, y se mezclaron volumen a volumen con buffer A 2X. Se agregó un volumen de los anticuerpos  $\alpha$ PRAs de levadura suficiente para tener una dilución 1/800 y la "mezcla de incubación" se mantuvo en agitación toda la noche a 4°C. También se preparó una suspensión de 50 mg/ml de Sefarosa proteína A en buffer A 1X (Tris HCl pH 7.5 10 mM; NaCl 150 mM; EDTA 1 mM; Nonidet P-40 0.05%) y se dejó hidratar toda la noche. Al día siguiente se tomaron 80 µl de esta suspensión y se mezclaron con la "mezcla de incubación" durante 2 horas a 4°C. Se prepararon columnas de fibra de vidrio en puntas de micropipetas, por las cuáles se pasó la "mezcla de incubación" con la Sefarosa. La fibra de vidrio retuvo a la Sefarosa que se lavó inmediatamente con 3 volúmenes de buffer B (Tris HCl pH 7.5 100 mM; NaCl 1 mM; EDTA 1 mM; Nonidet P-40 0.05%; Tritón X-100 0.25%) primero y con 2 volúmenes de buffer A (Tris HCl pH 7.5 10 mM; NaCl 150 mM; EDTA 1 mM; Nonidet P-40 0.05%) después. Las proteínas ácidas inmuprecipitadas se eluyeron con 150 µl de buffer de muestra para proteínas ribosomales (Tris HCl pH 6.8 0.05%; SDS 1%;  $\beta$ -mercaptoetanol 1%; EDTA 0.02 M; Glicerol 10 %; azul de bromofenol 0.002%, urea 8 M).

Las proteínas se analizaron por Western blot en las condiciones ya descritas.

#### Medición de la incorporación de metionina $^{35}\text{S}$ a proteína.

Se tomaron 50 µg de proteínas ribosomales totales y también de proteínas citoplásmicas provenientes de ejes previamente incubados con metionina  $^{35}\text{S}$ , como se indicó para la síntesis *in vivo* de proteínas. Se depositaron en frascos viales de vidrio bien lavados y secos y se les agregaron 5 ml de líquido de Bray (PPO 0.4% p/v; POPOP 0.02% p/v; naftaleno 6%

p/v; etilenglicol 2 p/v; metanol 10% v/v; disolver en dioxano). Se leyó en el contador de centelleo (minaxi  $\beta$  de PACKARD).

#### Autoradiografía.

Esta técnica se utilizó para visualizar las bandas radioactivas de las proteínas (en geles secos de acrilamida) o bien bandas de hibridación de los análisis por la técnica de Northern blot (ver adelante). La membrana de nylon, o bien el gel seco de acrilamida, se depositó sobre una placa de autoradiografía usada (o cualquier otra mica) y se cubrió con plástico Egapack, evitando la presencia de burbujas y de arrugas. En oscuridad se le colocó sobre una placa Kodak X-Omat. Después de transcurrido el tiempo de exposición se llevó a cabo el revelado de la placa usando una solución reveladora y una solución fijadora de Kodak (GDX), se siguieron las instrucciones del fabricante como a continuación se indica:

La placa se sumergió 5 minutos en solución reveladora y después se sacó con pinzas y se metió 1 minuto en solución de ácido acético (15 ml de ácido acético glacial en un litro de agua). A continuación se pasó a la solución fijadora durante 3 minutos. Inmediatamente se le dió un lavado con abundante agua de la llave y se colgó para que escurriera teniendo cuidado de no rayar la placa.

#### **5.- Identificación de los RNAm de las proteínas ribosomales ácidas**

Para eliminar la acción de RNAsa exógena y obtener mejores rendimientos en la obtención de RNA total y mensajero se tomaron las siguientes precauciones:

Siempre se trabajó con guantes.

El agua desionizada se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15-20 minutos.

Todo el material de plástico (puntas de micropipetas y tubos Eppendorf) se usó únicamente nuevo y también se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15-20 minutos.

Todo el material de vidrio se esterilizó en horno a 170 °C al menos durante 8 horas, recubriendo la boca de los recipientes con papel aluminio. El lugar de trabajo se limpió

diariamente con agua y luego etanol. Se procuró no hablar cuando se estuviera trabajando con RNA. Se utilizó un mechero para tener un área estéril.

Hay que señalar que todo el EDTA que se usó fue a partir de soluciones "madre" llevados a pH 8.0 y con una concentración 0.5 M.

#### Extracción de RNA total de células vegetales (Logemas et al., 1984)

Se tomó 1 gramo de ejes embrionarios preparados como se describió y se pulverizó en un mortero estéril agregando nitrógeno líquido, inmediatamente el polvo se transfirió a un tubo córex estéril de 50 ml (previamente enfriado en hielo) evitando que la muestra se descongelara. Sin perder tiempo se agregaron 12 ml de buffer Z6 (8M de cloruro de guanidinio -o bien tiocianato de guanidinio 4M-; MES pH 7 20 mM; EDTA 20 mM) y 300  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol. Se mezcló con vórtex y se agregaron 6 ml de fenol y 6 ml de una mezcla cloroformo-alcohol isoamílico (en una relación de 96:4). Nuevamente se agitó con vórtex hasta que la muestra estuviera bien mezclada (en este punto se puede dejar la muestra en baño de hielo y se puede empezar la extracción de otra muestra. No dejar más de cuatro muestras en este punto). A continuación se centrifugó durante 30 minutos a 12000g a temperatura ambiente (superior a 10°C, el resto de las centrifugaciones de toda esta metodología se hicieron a 4°C). Se tomó el sobrenadante y se agregó 1/10 del volumen de ácido acético 1M y 0.7 volúmenes de EtOH absoluto. Después de esto se dejó precipitar 20 minutos a -70°C. Pasado este tiempo, se centrifugó durante 10 minutos a 12000g y se eliminó el sobrenadante. Se añadieron 10 ml de EtOH al 70% y se agitó bien con vórtex, después de lo cual se centrifugó durante 10 minutos a 12000g y se eliminó el sobrenadante. Se repitió el lavado con EtOH al 70%. Al precipitado resultante se le añadió 1 ml de acetato de Na 3M y se agitó bien con vórtex. Se centrifugó durante 10 minutos a 12000g, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó 2 veces con 10 ml de EtOH al 70%. Se dejó el precipitado en el tubo cerrado boca abajo por 20 minutos a temperatura ambiente para escurrir el etanol (o toda la noche a 4°C). Una vez pasado este tiempo la mezcla de ácidos nucleicos se disolvió en 3 ml de agua estéril y se adicionaron 3 ml de LiCl 4 M y 3 ml de



urea 8 M. Se dejó en reposo de 3 a 4 horas a 4°C y se centrifugó durante 10 minutos a 12000g. Se eliminó el sobrenadante y se adicionó al pellet 1ml de acetato de Na 3 M. Nuevamente se agitó bien en vórtex (tratando de deshacer el pellet). Se centrifugó durante 10 minutos a 12000g, se eliminó el sobrenadante y se lavó 2 veces el pellet con 10 ml de EtOH al 70%. El tubo corex se dejó escurrir de 20 a 30 minutos boca abajo (procurando que todo el etanol se evaporara o escurriera) y el pellet se disolvió en la mínima cantidad de agua. La solución se pasó a un tubo Eppendorf. Se tomaron alicuotas y se leyeron las absorbencias a 230, 260, 280 y 330 nm en un espectrofotómetro.

Para que un RNA extraído con esta técnica se considere puro y listo para usarse se deben obtener los siguientes datos:

- i) El coeficiente 260/280 debe ser cercano a 2
- ii) El coeficiente 260/230 > 2
- iii) La absorbencia a 330 nm debe de ser prácticamente igual a cero.
- iv) Además se tiene que correr en un minigel nativo para ver su integridad.

La concentración total se calcula con la fórmula siguiente:

$$\mu\text{g RNA/ml} = \text{Abs}^{260}(42.5)(\text{factor de dilución})$$

#### **Extracción de RNA total de levadura (Ausubal et al., 1992)**

Se determinó la densidad óptica de un cultivo de levadura crecido en las condiciones que se mencionaron y se transfirió un volumen de cultivo correspondiente a  $10^{10}$  células a un frasco para cosechar células de 250 ml, conteniendo un volumen de agua helada. Aproximadamente  $2 \times 10^7$  células/ml tienen una densidad óptica a 600 nm entre 0.5 y 1.0. La muestra se centrifugó 5 minutos a 4°C a 5000 RPM (4500g). Después de esto se aspiró el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 15 ml de RNA Buffer (NaCl 500 mM; Tris HCl pH 7.5 200 mM; EDTA 10 mM) y se transfirió a un tubo córex de 25 ml estéril. Se centrifugó 5 minutos a 4°C a 3000g, se aspiró el sobrenadante y se resuspendió en 5 ml de RNA Buffer (aquí se pueden guardar a -70°C si es necesario). Se adicionó un volumen de

perlas igual a 5 gramos (Perlas de vidrio tratadas con ácido nítrico, lavadas y esterilizadas en horno) y se adicionaron 15 ml de la mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (en una proporción 25:24:1, equilibrado con RNA buffer). Las levaduras se agitaron en vórtex 5 minutos a máxima velocidad para romper su pared celular enfriando en hielo. Inmediatamente después se centrifugaron 5 minutos a 3000g y a 4°C y la fase acuosa se transfirió a otro tubo córex (unos 4 ml). Al tubo con la mezcla de levaduras y esferas de cristal nuevamente se le adicionó un volumen igual (5 ml) de la mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico. Se volvió a agitar en vórtex y se centrifugó bajo las mismas condiciones. Esta fase acuosa se mezcló con la primera, se adicionaron 3 volúmenes (12 ml) de etanol al 100% frío (4°C) y se guardaron 30 minutos a -20°C. Transcurrido este tiempo se centrifugó a 4°C 10 minutos a 12000g. Se aspiró el sobrenadante y el pellet se lavó con etanol frío al 70% centrifugando a 4°C 10 minutos a 12000g. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se dejó escurrir para quitar el etanol. El RNA obtenido finalmente se resuspendió en 2 ml de agua. Se determinó la pureza y la concentración de la muestra y se verificó la integridad de la misma manera que para el RNA obtenido de células vegetales. Teóricamente si se usaron  $10^{10}$  células se deberían obtener 5 mg de RNA total.

#### Extracción de RNAm de levadura (Aviv & Leder, 1972)

El RNA total obtenido por el procedimiento anterior se calentó a 65°C durante 5 minutos. Después se añadió un volumen de buffer de carga 2X (Tris HCl pH 7.5 20 mM; NaCl 1000 mM; EDTA 2 mM; SDS 0.2%) y se mezcló con la resina agitando suavemente de 15 a 20 minutos. Se centrifugó a 1500 RPM durante 5 minutos en microfuga, se retiró el sobrenadante y se lavó 2 veces con 2 volúmenes de buffer de carga 1X (Tris HCl pH 7.5 10 mM; NaCl 500 mM; EDTA 1 mM; SDS 0.1%) centrifugando a la misma velocidad. Se lavó de 3 a 4 veces con 1 volumen de buffer de lavado 1X (Tris HCl pH 7.5 10 mM; NaCl 100 mM; EDTA 1 mM; SDS 0.05%) centrifugando a la misma velocidad y eliminando el sobrenadante en cada caso. La resina fue eluida finalmente con 1 volumen de buffer de

elución (Tris HCl pH 7.5 10 mM; EDTA 1 mM; SDS 0.05%) centrifugando a 2000 RPM durante 5 minutos en microfuga. Este lavado de elución se repitió y ambos eluidos se mezclaron y se precipitaron con acetato de Na 0.3 M final y 2.5 volúmenes de etanol durante toda la noche a -20°C. Al día siguiente se centrifugó a 9000g durante 12 minutos a 4°C. El precipitado se resuspendió en el volumen mínimo de agua estéril y se leyó la absorbancia de la muestra a 260 nm. La cantidad de RNA se calcula de la misma manera que para el RNA total. La integridad del RNA se verificó en un minigel no desnaturizante.

#### Minigel no desnaturizante para RNA y DNA (Clemens, 1984)

Este tipo de geles se utilizó para ver la integridad de las muestras de RNA total y mensajero (poliA), también para correr DNA plasmídico sometido a la acción de enzimas de restricción. La concentración de agarosa usada (1%) sirve para resolver bien bandas de 0.5 a 7 kB.

Para hacer el gel se diluyó el buffer TAE 50X (Tris básico 2 M; EDTA 0.1 M; ácido acético glacial 1M) a una concentración 1X y en éste se hizo una suspensión de agarosa libre de RNAsa al 1%. Se agitó bien y se suspendió calentando en el horno de microondas. Una vez que la agarosa se hubo disuelto, se dejó enfriar lentamente hasta una temperatura de unos 40 °C. Se agregaron 5 µl de bromuro de etidio (0.5 µg/ml; **peligro** es carcinogénico), se homogenizó y se vaciaron entre 35 y 40 ml en la cámara de gelificación que viene en los aparatos. Mientras la suspensión se gelificaba se prepararon las muestras: alrededor de 1 µg de ácidos nucleicos y 1 µl del buffer de carga no desnaturizante para ácidos nucleicos (EDTA 10 mM; glicerol 50%; Azul de Bromofenol 0.4%; xilencianol 0.4%) El gel se depositó en la cámara de electroforesis y se llenó con TAE 1X hasta cubrir los pozos. La muestra se depositó con una micropipeta directamente en los pozos dejando caer la muestra despacio y con cuidado. Se aplicó un voltaje de 70 volts al principio y de 90 volts una vez que la muestra había entrado al gel (la muestra quedó lista al cabo de 1 hora y media aproximadamente). Los ácidos nucleicos se visualizaron con la ayuda de un transiluminador

de luz ultravioleta gracias a la fluorescencia que les proporciona el bromuro de etidio que se encuentra intercalado en las cadenas.

## **6.- Manejo de las sondas moleculares**

### **Obtención de DNA plasmídico [Maxipreparación (Birnboim & Doly, 1979)]**

Con ésta técnica se obtiene suficiente DNA para secuenciar o hacer unos 200 ensayos de Northern blot. Se crecieron las cepas de *E. coli* que contenían el plásmido de interés como se mencionó. Transcurrido el tiempo de incubación las células se centrifugaron a 3000g durante 10 minutos en rotor JA-20 de Beckmann, la pastilla de células se resuspendió en 5 ml de NaCl 10 mM y se volvió a centrifugar, después de esto la pastilla de células se resuspendió en 0.6 ml de buffer de lisis (Tris HCl pH 8 25 mM; EDTA 10 mM; sacarosa 15%; lisozima 2 mg/ml) y se incubó durante 20 minutos en hielo para debilitar la pared celular. Se agregaron 1.2 ml de una solución de NaOH 0.2 N y 1 % de SDS preparada al momento, se agitó en vórtex 20 segundos y se incubó por 10 minutos en hielo. Se agregaron 0.75 ml de acetato de Na pH 5.0, se agitó en vórtex 20 segundos y se incubó en hielo por 20 minutos. En seguida se centrifugó 15 minutos a 5900g y el sobrenadante fue transferido a un tubo córex nuevo estéril. Se le adicionaron 5 µl de RNAsa (Sigma) que tenía una concentración de 10 µg/ml, se incubó 30 minutos a 37 °C. Se extrajo 2 veces con un volumen igual de fenol:cloroformo (1:1), se centrifugó 15 minutos a 900g, y se recuperó la fase superior. La muestra se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto (a -20 °C) por 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó durante 10 minutos a 7000g desechándose el sobrenadante. A continuación el pellet se lavó dos veces con etanol al 70% centrifugando 5 minutos a 5900g. El pellet se resuspendió en 168 µl de agua estéril y la muestra se transfirió a un tubo Eppendorf estéril al cual le fueron adicionados 32 µl de NaCl 5 M. Se mezcló perfectamente y se adicionaron 200 µl de PEG 8000 al 13%. Se mezcló bien y se incubó por una hora. Transcurrido el tiempo de incubación se centrifugó en microfuga en frío por 10 minutos a 9000g. El pellet obtenido se lavó dos veces con etanol al 70%

cuidando de dejar la pastilla al final perfectamente seca la que finalmente se resuspendió en 50 µl de agua estéril y se leyó la absorbancia a 260 y 280 nm. La relación 260/280 se mantuvo entre 1.8 y 2.0. La concentración de DNA se obtuvo considerando que 50 µg de DNA/ml tienen una absorbancia a 260 nm igual a uno.

Obtención de insertos de DNA mediante el empleo de enzimas de restricción (Maniatis et al., 1984; Ausubel et al., 1992).

Con esta técnica se obtuvieron los fragmentos de DNA plasmídico que se utilizaron para efectuar los análisis de Northern blot a partir del DNA plasmídico obtenido con las técnicas anteriores. El tamaño de los fragmentos se determinó comparando con fragmentos de DNA del fago Lambda obtenidos por corte con enzimas de restricción y resuelto en un minigel nativo. Para obtener un buen estándar en suficiente cantidad se siguieron los siguientes pasos en ese orden: Se colocaron 82.5 µl de agua en un Eppendorf estéril y se añadieron 10 µl del buffer B (Boehringer). Después se añadieron 5 µl de DNA del fago Lambda al que se le añadieron 1.25 µl de la enzima Hind III. Se incubó a 37°C durante 1 hora. Terminado este tiempo se añadieron 1.25 µl de la enzima Eco RI y se continuó la incubación a 37°C durante otra hora. Se tomaron 12 µl de la solución anterior para correr en un minigel nativo.

Para los plásmidos que se cortaron se siguió el mismo procedimiento pero cambiando las cantidades lo que se muestra a continuación:

	Plásmido	<u>PVR45</u>	<u>PMRE44</u>	
i)	<b>DNA</b>	2 µl	2 µl	
ii)	<b>Agua desionizada</b>	14 µl	15 µl	
iii)	<b>Buffer B</b>	2 µl	2 µl	
iv)	<b>Hind III</b>	1 µl	1 µl	Se incubó 30 minutos a 37°C
	<b>Pst I</b>	1 µl	-	Se incubó otros 30 minutos a 37°C
	<b>Volumen total</b>	20 µl	20 µl	

La cantidad de DNA que se agregó equivale a 6 µg.

\* Los mapas de restricción de éstos plásmidos se muestra en las páginas 26 y 27.

### Recuperación del fragmento de interés del minigel no desnaturalizante.

[Filtración a través de fibra de vidrio ]

Se perforó un tubo Eppendorf de 500  $\mu$ l en su parte inferior con una aguja caliente. En el fondo se empaquetó un colchón de fibra de vidrio (pelo de ángel) estéril. Se cortó la banda de DNA de interés del minigel nativo con una navaja estéril, procurando llevarse la menor cantidad de agarosa. Se partió en cuatro fragmentos que se depositaron en el fondo del tubo Eppendorf cuidando de que los fragmentos no quedaran sobrepuestos. Este Eppendorf se colocó dentro de otro Eppendorf estéril de 1500  $\mu$ l y el sistema se centrifugó a 3000 RPM en microfuga durante 2 minutos. El inserto se obtiene del líquido que queda en el tubo de 1500  $\mu$ l. Para ver si el inserto fue debidamente purificado y para tener una idea de su concentración se tomó una alícuota y se corrió en otro minigel.

### Marcado radioactivo de sondas moleculares (Feinberg & Vogelstein, 1983; 1984)

Se utilizó la técnica de Random Primer Extension (de Dupont) cuyo kit trae agua, mezcla de nucleótidos, amortiguador y la fracción Klenow de la DNA polimerasa I. El volumen final debe ajustarse a 30  $\mu$ l contando 6  $\mu$ l de amortiguador, 6  $\mu$ l de la mezcla de nucleótidos, 1  $\mu$ l de la enzima, de 2 a 5  $\mu$ l de dCTP marcado con  $^{32}$ P y el volumen necesario de la sonda para tener unos 60 ng de DNA, agregando el agua que tiene el kit de ser necesario.

Se tomaron 50 ng del inserto purificado por filtración a través de fibra de vidrio y se llevaron a un volumen de 16  $\mu$ l con agua que tiene el kit. Se incubaron a ebullición 3 minutos y luego se incubaron 2 minutos en hielo. En otro Eppendorf se depositaron 6  $\mu$ l de la mezcla de nucleótidos del kit, 6  $\mu$ l de el buffer y 1  $\mu$ l de la marca (dCTP  $^{32}$ P). Al terminar el tiempo de incubación el inserto se centrifugó para concentrarlo en el fondo del tubo y tomarlo todo con una micropipeta. De esta manera se depositó en el Eppendorf con la mezcla de nucleótidos, buffer y marca. Se adicionó 1  $\mu$ l de la fracción Klenow y se dejó en reacción toda la noche a temperatura ambiente o 3 horas a 37°C. Al terminar este tiempo el inserto se

purificó pasándolo por una columna de Sephadex G-50 previamente preparada (se describe más adelante). La actividad se midió tomando 1  $\mu$ l de la sonda purificada que fue depositado en un Eppendorf limpio y éste a su vez se depositó en un tubo vial en donde se midió la actividad mediante el contador de centelleo.

#### Columna de exclusión molecular (Maniatis et al., 1984; Ausubal et al., 1992):

La resina seca de Sephadex G-50 se hidrató con 5 volúmenes de buffer TE (Tris HCl pH 7.4 10 mM; EDTA 1 mM). Se tomó una jeringa para insulina con aguja removible y se le puso fibra de vidrio en la punta. Se agregó la resina en TE a la jeringa cuidando de que no hubiera burbujas y la jeringa se colocó dentro de un tubo córex de tamaño suficiente para que ésta no toque el fondo. Se centrifugó por 3 minutos a 3000 g con lo que todo el TE se sale de la jeringa. Se agregó más resina en TE y se centrifugó hasta alcanzar la marca de los 0.8 ml. Una vez logrado esto, la columna se lavó con 0.3 ml de buffer. Después se empacó centrifugando a las mismas condiciones. Se colocó un Eppendorf sin tapa en el fondo del córex para recibir al inserto marcado, el que se llevó a 100  $\mu$ l con buffer TE, se centrifugó 3 minutos a 3000g (el inserto queda en el Eppendorf que se colocó). Se agregaron otros 100  $\mu$ l de TE a la columna y se centrifugó. Finalmente se recuperó el Eppendorf del fondo del tubo con mucho cuidado y se obtuvo la marca lista para usarse.

### **7 - Análisis por Northern Blot**

#### Electroforesis de RNA en geles desnaturalizantes de agarosa (Thomas, 1980)

Estos geles se utilizaron para resolver las muestras de RNA que se transferirían a membranas de nylon para hibridar con las sondas marcadas radioactivamente. El gel se preparó suspendiendo en un matraz 3.75 gramos de agarosa en 186.5 ml de agua estéril. Una vez que la resina se hidrató se calentó poco a poco en el horno de microondas hasta llegar a ebullición (IMPORTANTE: Nunca agregar agua caliente). Después de esto la suspensión se dejó enfriar lentamente hasta alcanzar una temperatura de 40°C

aproximadamente, en este momento se agregaron 13.5 ml de formaldehído al 37% y 5 ml de buffer MOPS 5X (MOPS pH 7 100 mM; acetato de sodio 40 mM; EDTA 5 mM) y se vació en el molde del aparato. Se dejó gelificar a temperatura ambiente. Las muestras se cargaron en el gel (ver adelante pretratamiento de las muestras de RNA) y se aplicó el voltaje indicado por el fabricante. El buffer de corrida que se usó es el buffer MOPS 1X.

#### Pretratamiento de las muestras de RNA

Se tomaron 30  $\mu\text{g}$  de RNA total y se llevaron a 90  $\mu\text{l}$  con agua estéril. En el caso del RNA poliA se tomaron 6  $\mu\text{g}$  y se adicionaron 9  $\mu\text{g}$  de RNA de transferencia. Hecho esto se precipitó el RNA agregando 10  $\mu\text{l}$  de acetato de Na 3 M y 250  $\mu\text{l}$  de etanol al 100 %. Se refrigeró a  $-70^{\circ}\text{C}$  toda la noche. Después de este tiempo se centrifugó a 13000g durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . El precipitado se lavó con 200  $\mu\text{l}$  de etanol al 75% y se centrifugó a 13000g durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . El precipitado se secó bien con una micropipeta y se añadieron 50  $\mu\text{l}$  de buffer NBSB (formamida 50%; Forlmaldehído 7%; Azul de Bromofenol 1%; buffer MOPS 1X C.B.P. 100%). Se añadió un  $\mu\text{l}$  de bromuro de etidio, se agitó en vórtex y se concentró con un pulso de centrifuga. Las muestras se desnaturalizaron calentando en parrilla eléctrica a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos. Pasado este tiempo se colocaron 10 minutos en hielo. Se concentró el contenido de cada Eppendorf en el fondo del tubo con un pulso de microcentrifuga. Hecho esto las muestras se cargaron inmediatamente en el gel desnaturalizante y se corrieron.

#### Transferencia de RNA del gel a una membrana de nylon (Thomas, 1980)

Una vez que se llevó a cabo la electroforesis, el RNA se pasó a una membrana de nylon como soporte sólido para poder llevar a cabo la hibridación. Para este fin se utilizó un refractario de vidrio el que se limpió con agua estéril. Sobre él se colocó una caja petri de 15 cm de diámetro y sobre ésta una placa de vidrio. Se cortó un papel Whatman 3 MM de tamaño suficiente que sus bordes longitudinales sobresalieran del vidrio unos 2 cm y se



humedeció en buffer SSC 10X (20X= NaCl 3 M; citrato de sodio 0.3 M). Con este buffer se llenó el refractario hasta una altura inferior a la placa de vidrio, pero que humedezca los bordes del papel. Enseguida se colocaron otros tres papeles humedecidos en SSC 10X cortados del tamaño del gel a transferir, colocando uno por vez y cuidando de que no hubiera burbujas. Enseguida se colocó el gel y sobre éste la membrana de nylon del tamaño del gel previamente humedecida 30 minutos en agua y 10 minutos en el buffer SSC 10X. Sobre la membrana se colocaron otros tres papeles Whatman cortados y humedecidos como se mencionó. Sobre estos últimos papeles se colocaron 10 cm de papel periódico cortado del tamaño del gel y sobre éstos se puso una placa de vidrio de 0.5 kg con el fin de comprimir al papel periódico y que el agua suba por capilaridad a través del periódico y del gel arrastrando las moléculas de RNA que quedarán en la membrana. El sistema se cubrió con plástico para evitar la evaporación. Se dejó transferir toda la noche (al menos 4 horas) sin mover el sistema. Transcurrida la transferencia se recuperó con cuidado la membrana y se marcó la cara que estuvo en contacto con el gel. La membrana se fijó con luz ultravioleta durante 2 minutos a una intensidad de 1200 joules/m<sup>2</sup> con la cara que estuvo en contacto con el gel de frente al rayo de luz. Después de esto la membrana quedó lista para la hibridación.

#### **Hibridación (Meinkoth & Wahl, 1984)**

La membrana con el RNA fijado se puso a prehibridar durante 2 horas a una temperatura de 60°C en un recipiente al que se le añadieron 1.5 ó 3 ml de buffer de hibridación (fosfato de sodio pH 7.2 0.25 M; SDS 7%; albúmina sérica bovina 1%; EDTA 1 mM) en caso de que se tratara de un tubo Falcon o de un cilindro de vidrio de hibridación, respectivamente. Transcurrido el tiempo de prehibridación se agregó la sonda marcada radioactivamente y acabada de desnaturalizar (calentando 3 minutos en ebullición y después incubando 2 minutos en hielo). Se dejó hibridar al menos 16 horas a una temperatura de 60°C y se hicieron los siguientes lavados monitoreando la cantidad de marca radioactiva. Esta debe

estar entre 200 y 600 CPM en el último lavado. Primero se hizo un lavado de 15 minutos a temperatura ambiente en buffer SSC 2X y SDS 0.1%. Después se hizo un segundo lavado de 20 minutos en buffer SSC 1X y SDS 0.1% a la misma temperatura de hibridación. Se hizo un tercer lavado también en buffer SSC 1X y SDS 0.1 % a la misma temperatura de hibridación pero durante 40 minutos en los casos en que la marca fuera todavía muy alta (arriba de 800 CPM) . Después de lavar la membrana se sometió a una autoradiografía como ya se explicó.

#### IV.-RESULTADOS

##### Curvas de Calibración de masa molecular

Para saber la zona en que la masa molecular de los marcadores se desplazan de una manera lineal en geles pequeños de acrilamida bajo las condiciones experimentales usadas se corrieron dos electroforesis. Los marcadores se transfirieron a membranas de PVDF de la misma manera que se hizo para el Western blot. Midiendo la distancia de corrimiento de las proteínas y graficándola contra el logaritmo natural ( $\ln$ ) de la masa molecular de cada marcador se obtuvieron las siguientes curvas cuyos datos se resumen en la tabla 1 y se grafican en la figura 4.1:

Tabla 1.- Curvas de Calibración de masa molecular para proteínas

MM (kD)	$\ln$ MM	Curva St 1 Distancia
36	1,5563025	0,8
29	1,4623979	1,45
24	1,3802112	1,95
20	1,3010299	2,5
14,4	1,1583624	3,35

Cor=0.9996

MM (kD)	$\ln$ MM	Curva St 2 Distancia
36	1,5563025	1,05
29	1,4623979	1,8
24	1,3802112	2,3
20	1,3010299	2,7
14,4	1,1583624	3,4

Cor=0,9934

En las gráficas de la figura 4.1 podemos apreciar que la región entre 14.4 y 20 kD no es muy confiable porque se pierde linealidad; sin embargo, las regiones comprendidas entre 20 y 36 kD son más lineales. Ambas curvas nos dan un coeficiente de correlación superior a 0.9900.

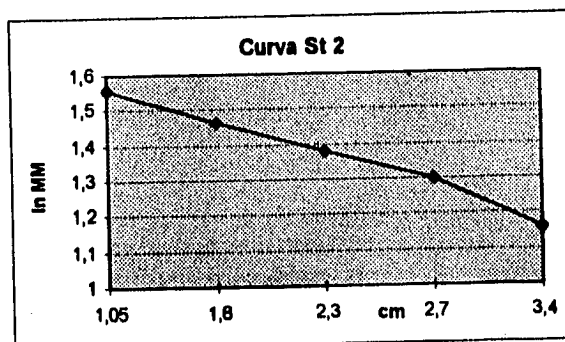
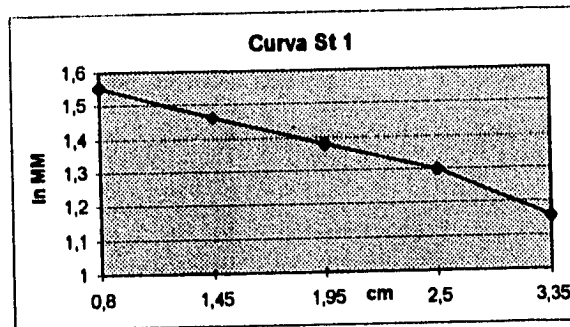


Figura 4.1: Los marcadores de masa molecular para proteínas se resolvieron en geles de poliacrilamida al 14%, se midió la distancia de corrimiento de las proteínas y se graficó vs. el ln de la masa molecular.

### Western Blot

Después de calibrar los geles de acrilamida las muestras de extractos de proteínas del ribosoma y del sobrenadante (citoplásmicas) se sometieron a electroforesis bajo las mismas condiciones que los marcadores. Las proteínas citoplásmicas fueron concentradas por el método de Zinker (1980). Las muestras fueron obtenidas de ejes embrionarios de cero (secos) y de 24 horas de germinación. Posteriormente se transfirieron a membranas de PVDF y se buscó con anticuerpos la presencia de proteínas ribosomales ácidas en un ensayo de Western blot. En la figura 4.2 se muestran los resultados de estos experimentos.

En el carril 1 (correspondiente a las proteínas ribosomales totales de ejes secos) se ven dos bandas con masas de 13.5 y 20.3 kD. En el carril 3 (correspondiente a las proteínas

ribosomales totales de ejes de 24 horas de germinación) se aprecian dos bandas también con masas moleculares de 13.5 y 20.3 kD y se encuentra una tercera banda con una masa de 37 kD. Estas bandas podrían corresponder a P0 (la de 37 kD), P1 (la de 20 kD) y P2 (la de 13.5 kD) de maíz. En los carriles 2 y 4 que corresponden a las proteínas citoplásmicas de ejes secos y de 24 horas de germinación respectivamente no se encontraron estas bandas, pero hay cruces que parecen ser inespecíficos en la zona comprendida entre 28.7 y 39.8 kD. Estos resultados se resumen en la tabla 2.

**Tabla 2.- Masas moleculares del Western blot**

**Masas Moleculares de proteínas ribosomales ácidas**

<u>Primera Banda</u>		<u>Segunda Banda</u>		<u>Tercera Banda</u>	
Seco	24 horas	Seco	24 horas	Seco	24 horas
13,5	13,5	20,3	20,3	-	37

En el último carril se ve una mancha correspondiente a anticuerpos de conejo que también se sometieron a electroforesis y que fueron usados como control positivo para ver si el segundo anticuerpo (el conjugado con peroxidasa) daba la reacción. La mancha es muy burda por que pusimos un exceso de proteína.

### **Síntesis *In Vivo***

Para averiguar en que tiempo se empezaban a sintetizar las proteínas que fueron reconocidas por nuestros anticuerpos se extrajeron proteínas ribosomales de ejes previamente incubados a diferentes intervalos de tiempo marcados con metionina <sup>35</sup>S como se indicó en la metodología. Las proteínas ribosomales se analizaron en un minigel, el cual se secó y se expuso a una autoradiografía.

En la Tabla 3 se enlistan las bandas que aparecen en la autoradiografía como bandas que incorporan marca y se señalan con una flecha las proteínas que por su peso molecular se asemejan a las proteínas ribosomales que se detectaron en el Western blot y que parecen ser las proteínas P1, P2 y P0.

Tabla 3.- Síntesis *in vivo*. Autoradiografía de Proteínas Ribosomales

<u>PM</u>	<u>3 horas</u>	<u>6 horas</u>	<u>24 horas</u>	<u>PRA</u> s
14	-	-	+	← P2
23,2	-	-	+	← P1
24,9	-	-	+	
28,7	-	+	+	
33,1	-	-	+	
36,6	-	-	+	← P0

En esta tabla vemos que casi no existe síntesis de proteínas ribosomales en las primeras 6 horas de germinación, sin embargo el extracto de 24 horas de germinación muestra varias bandas en donde se incorporó marca. Esto nos indica que la síntesis de algunas proteínas ribosomales, entre ellas las PRA, se lleva a cabo prioritariamente entre las 6 y las 24 horas de germinación.

Para comprobar como se comportaba la síntesis global de proteínas durante la germinación, tanto de proteínas ribosomales como citoplásmicas, se incubaron ejes durante 3, 6 y 24 horas con un pulso de metionina durante las últimas 3 horas de germinación. Las proteínas citoplásmicas servirían como control ya que se sabe que son las proteínas que se empiezan a sintetizar desde la primera hora de comenzada la germinación (Marcus et al, 1966).

Se midió la incorporación de metionina <sup>35</sup>S de estas muestras (tanto en la fracción citoplásmica como en las proteínas ribosomales) tomando 50 µg de proteína en cada caso. Estos datos se muestran en la Tabla 4 y se grafican en la figura 4.3:

Tabla 4.- Incorporación de <sup>35</sup>S expresado en CPM por 50 µg de proteínas citoplásmicas o ribosomales.

	<u>3H</u>	<u>6H</u>	<u>24H</u>
	CPM/50 µg de proteína	CPM/50 µg de proteína	CPM/50 µg de proteína
Proteínas ribosomales	1573	2425	7713
Proteínas citoplásmicas	16366	15807	15080

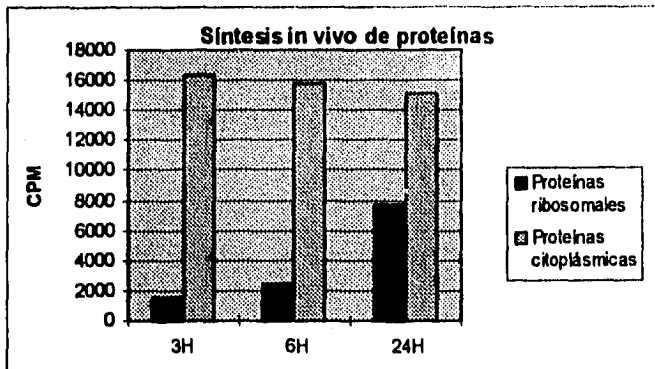


Figura 4.3: Incorporación de <sup>35</sup>S expresado en CPM por cada 50 μg de proteínas.  
 \* La "H" representa horas de germinación.

En esta gráfica se puede apreciar que la capacidad de síntesis de proteínas citoplásmicas es alta y prácticamente constante desde el inicio de la germinación hasta las 24 horas. Por el contrario la capacidad de síntesis de proteínas ribosomales es muy pequeña al inicio de la germinación, esta capacidad aumenta a las 6 horas tan solo en un 50%, pero a las 24 horas aumenta en un 220% respecto de la velocidad de 6 horas.

### Inmunoprecipitación

Con el fin de bloquear la transcripción en la germinación y saber si en estas condiciones se encontraban PRAs unidas a los ribosomas, se pusieron a germinar ejes por 3, 6 y 24 horas con y sin el tratamiento previo con α-amanitina. Se extrajeron proteínas ribosomales y citoplásmicas. Las muestras se concentraron por inmunoprecipitación con anticuerpos antiPRAs con el fin de obtener bandas más nitidas y detectar PRAs en el citoplasma (ya que no las habíamos encontrado en la concentración por el método de Zinker) por medio de un Western blot, en las condiciones en que se hicieron los ensayos anteriores.

Por este método tampoco fue posible observar alguna banda en la fracción citoplásmica que pudiera corresponder a las PRAs, mientras que en la fracción correspondiente a las proteínas ribosomales se observaron las bandas correspondientes a P1 y P2. La intensidad de las

bandas aumentó a lo largo de la germinación sugiriendo que existe síntesis de estas proteínas. Esto ocurrió con el tratamiento o sin el tratamiento de  $\alpha$  amanitina, lo cual sugiere que podría haber mensaje almacenado para PRAs, puesto que se observó que a las 24 horas en condiciones de inhibición de la transcripción existía síntesis de estas proteínas.

### **Detección de los mRNA para PRAs**

Con el fin de buscar los mensajes (mRNA) de las PRAs se realizaron experimentos de Northern blot. Se extrajo RNA total de ejes secos y de 3, 6, 9 y 24 horas de germinación. Para comprobar la pureza de el RNA extraído se leyeron las absorbancias a diferentes longitudes de onda. El resultado de las absorbancias fueron las siguientes:

**Tabla 6.- Absorbancia de muestras de RNA a diferentes horas de incubación**

<b>Longitud (nm)</b>	<b>Seco</b>	<b>3 horas</b>	<b>6 horas</b>	<b>9 horas</b>	<b>24 horas</b>
<b>230</b>	0.0475	0.1660	0.2032	0.2636	0.7829
<b>260</b>	0.1074	0.3316	0.4498	0.6209	1.600
<b>280</b>	0.5470	0.1753	0.1857	0.5469	0.8374
<b>330</b>	0.0028	0.0062	0.0067	0.0190	0.0195
<b>260/280</b>	1,96	1,89	2,42	1,14	3,02
<b>260/230</b>	2,26	1,99	2,21	2,35	2,05
<b>mcg/mcl</b>	0,456	1,4	1,91	2,6	6,8

En esta tabla podemos observar que los cocientes de las absorbancias tienen un valor cercano al valor teórico que se señaló en la parte de metodologías, lo que nos indica que tiene una pureza aceptable para ser usado en ensayos de Northern blot. También vemos que el rendimiento aumenta conforme transcurre la germinación; en todos los casos se empezó con 1 gramo de ejes y el volumen final en donde se disolvió el RNA fue el mismo.

Para ver la integridad de estas muestras de RNA se corrió un minigel nativo donde se observó que el mRNA no estaba degradado (figura 4.4) y donde se aprecian las bandas correspondientes al RNAr 28S y 18S.

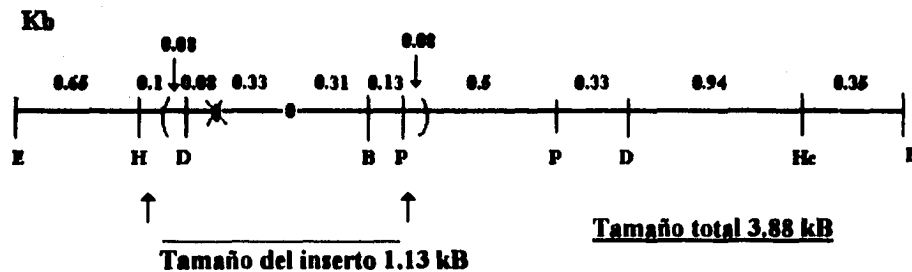


### Northern blot

Para saber si el mensaje para las PRAs se encontraba almacenado en los ejes de embrión de semilla madura, se hicieron diferentes hibridaciones. Debido a que se usaron sondas heterólogas, que reconocen PRAs de levadura, se probaron diferentes condiciones para tratar de obtener señales fuertes y con la menor cantidad de hibridación inespecífica.

A continuación se presenta el mapa de restricción de la primera sonda que se utilizó y se describen los experimentos que con ella se hicieron:

Plásmido PVR45 : (donada por el Dr. Samuel Zinker del CINVESTAV). Dentro del plásmido se encontraba un inserto con el gene para la proteína ácida de levadura YP2. Las letras indican los sitios de restricción del plásmido y las flechas debajo del mapa de restricción indican los cortes que se hicieron.



<u>Simbolo</u>	<u>Significado</u>
X	TAA
●	ATG
E	Eco RI
H	Hind III
D	Dro I
B	Boln II
P	Pst I
Hc	Hinc II
K	Kpn I
( )	Secuenciado

Esta sonda fue cortada con las enzimas Pst-I y Hind III (flechas inferiores en el mapa), se obtuvo un inserto con un tamaño de 1.13 kB. En la figura 4.5 se muestra una fotografía de estos cortes separándolos en un minigel no desnaturizante. El inserto de 1.13 Kb se cortó y se purificó por filtración en fibra de vidrio. Después se marcó con la técnica de Random Primer Extension y se procedió a hacer las hibridaciones.

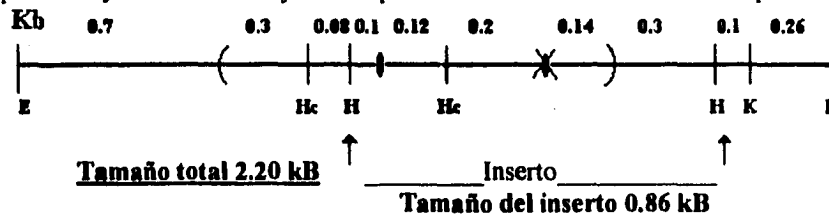
Para el experimento de la primera hibridación se utilizó RNA total de ejes a tiempos de germinación de 0, 3, 6, 9, 24 horas y como control RNA de levadura. En este experimento se trató de ver si la sonda heteróloga hibridaba con el RNAm de maíz. La membrana se incubó a 60°C, se dió un primer lavado como se indica en la metodología y un 2° lavado a 40°C. El Northern blot resultante se muestra en la figura 4.6. En esta figura hay mucha hibridación inespecífica y no se ven con claridad las bandas ni siquiera en el control de levadura, por lo que se probaron condiciones de mayor astringencia.

Se hibridó otra membrana que contenía RNA total y poli A de levadura (control) y RNA total de 0 y 50 horas de germinación y se incubó en un sistema sin agitación a 60°C. Para aumentar la astringencia con respecto a la hibridación anterior se hizo un 2° lavado a 60°C. En este experimento la inespecificidad fue mucho menor y aunque muy débiles se alcanzan a distinguir 3 bandas (figura 4.7) de 270, 413, y 1195 bases en la muestra de ejes secos (carril 3), y una banda de 1195 bases en ejes de 50 horas de germinación (carril 4), lo que se muestra en la figura 4.7. Por otro lado los controles de levadura, tanto el RNA total como el poliA, fueron reconocidos fuertemente por ésta sonda (carriles 1 y 2). En el mapa de restricción de PVR45 podemos ver que en el inserto obtenido existen zonas que no corresponden al gen y que posiblemente nos estén estorbando al dar hibridación inespecífica. Estas zonas comprenden segmentos regulatorios del mismo gen e incluso segmentos que forman parte del plásmido.

Para los siguientes experimentos se utilizó otra sonda heteróloga esperando mejorar el resultado que había dado la anterior, ya que era una sonda cuyo inserto se podía obtener con zonas pertenecientes al plásmido un poco más pequeñas a comparación de PVR45. Esto nos

podría dar una respuesta más limpia y fuerte. El mapa de restricción y los experimentos que con ella se hicieron se describen a continuación:

2) Plásmido PMRE44: (donada por el Dr. Juan Ballesta de la Universidad Autónoma de Madrid, en España), dentro de éste plásmido se encontraba un inserto con el mismo gene para la proteína ácida de levadura YP2. Las letras indican los sitios de restricción del plásmido y las flechas debajo del mapa de restricción indican los cortes que se hicieron.



<u>Simbolo</u>	<u>Significado</u>
✱	TAA
●	ATG
E	Eco RI
H	Hind III
D	Dro I
B	Boln II
P	Pst I
Hc	Hinc II
K	Kpn I
( )	Zona Secuenciada

Esta sonda fue cortada con la enzima Hind III y se obtuvo un inserto de un tamaño de 0.86 kB. En la figura 4.8 se muestra una fotografía de estos cortes separándolos en un minigel no desnaturante. El inserto se cortó, se purificó y se marcó como se indicó para la sonda anterior. Después se procedió a hacer las hibridaciones.

Se repitieron las condiciones usadas para el experimento 2 de la sonda PRVE45 usando otra membrana con RNA total y poli A de levadura (control) y RNA total de 0 y 50 horas de germinación. El segundo lavado se hizo a 60°C. En este experimento la inespecificidad fue poca, y se lograron detectar varias señales en maíz, lo que se muestra en la figura 4.9. En el eje seco se distinguen nuevamente las bandas de 270, 413 y 1195 bases, y también se

distinguen dos bandas tenues en la zona comprendida entre 660 y 760 bases. Por su parte el RNA de ejes de 50 horas de germinación muestra bandas de 270, 352 y 1195 bases. Esto resultados indican por una parte que muy probablemente existe RNAm para PRAs almacenado en las semillas en el estado seco. Por otra parte a 50 horas se ven 2 bandas que corresponden a 2 de las encontradas a 0 horas (270 y 1195 bases).

Se probaron condiciones de mayor astringencia, hibridando de 65 a 62°C, para ver cuales de las bandas encontradas seguían dando respuesta, y por tanto eran más homólogas al inserto usado. No se obtuvo respuesta para ninguna banda en este intervalo de temperaturas. Para redondear el punto anterior y estar seguros que estos mensajes están en la semilla desde antes de la germinación, se buscó el mensaje de PRAs en RNA total de 24 horas con el tratamiento de  $\alpha$ -amanitina. En la figura 4.10. vemos que la intensidad de las manchas es prácticamente igual y se vuelven a obtener las bandas de 270, 430, 1195 bases y dos bandas entre 660 y 760 bases.

## V.-DISCUSION DE RESULTADOS

Si bien en la investigación científica por cada pregunta contestada siempre surgen más por contestar en el presente trabajo cubrimos los objetivos que nos propusimos pero hay aspectos de las PRAs relacionados con la germinación que requieren más profundización. Por el momento explicaré los puntos principales que nuestro trabajo sostiene:

### 1) Relación entre las PRAs de maíz y las de otros organismos.

Las PRAs de maíz comparten algunas de las características que se han observado en otros organismos eucariotes. En primer lugar la semejanza inmunológica que comparten con las PRAs de levadura; ya vimos que en los Western blots (figura 4.2) anticuerpos preparados contra las PRAs de levadura reconocen a las PRAs provenientes de ribosomas de ejes embrionarios de maíz. Esta semejanza era de esperarse ya que se sabe que casi todas estas proteínas comparten los últimos 10 a 20 aminoácidos de la región del COOH terminal y se sabe que es la región más inmunogénica (Soto et al, 1993; Rich & Steltz, 1987). También las sondas heterólogas de levadura (YP2 de *Saccharomyces cerevisiae*) que utilizamos dieron reacción, aunque con una intensidad baja comparada con el control de levadura, con el mRNA de maíz (figura 4.9). Esto nos indica que existe cierto parecido en la secuencia general de los mensajes para ambos tipos de proteínas.

Por otro lado el tamaño de las proteínas que nuestros anticuerpos reconocen como PRAs y el tamaño de los mensajes encontrados concuerdan con la literatura ya que en las membranas de Western blot pudimos observar que en la fracción ribosomal existen 3 bandas de una masa molecular de 13.5, 20 y 37 kD (tabla 2). Los minigeles utilizados dan un cierto grado de error precisamente en la zona de 14 y 20 kD (figura 4.1), pero en otros trabajos hechos en el laboratorio se usaron geles grandes que dan una mejor resolución y el peso detectado fue de 14, 16 y 37 Kd pesos, de cualquier forma se han detectado grupos de proteínas entre 14 y 16 kD, alrededor de 20 kD y entre 37 y 40 kD (Schijman et al, 1992; Towbin et al, 1982). En el caso de los mensajes hay que señalar que el tamaño que tenemos no es muy exacto por

que usamos como marcador solo las bandas correspondientes al rRNA 18S y 28S, pero encontramos bandas de 1200 bases y entre 660 y 760 bases que corresponden al intervalo de masa de algunos mensajes encontrados (Rich & Steitz, 1987).

## 2) Modelo de la síntesis de PRAs y su relación con el ribosoma y otras proteínas ribosomales.

Encontramos a estas proteínas integradas a los ribosomas de ejes embrionarios provenientes de semillas maduras lo que nos hablaría de la importancia que tienen para el inicio de la germinación. No alcanzamos a detectar síntesis de ellas (de PRAs) en las primeras 6 horas de germinación (tabla 3), es posible que el sistema usado nos sea lo suficientemente sensible, pero a las 24 horas de germinación ya existe una importante síntesis de PRAs (aunque es muy probable que se estuvieran sintetizando antes de ese tiempo) y que coincide con un aumento en la cantidad de PRAs detectada en la inmunoprecipitación a 24 horas de germinación. Otras proteínas ribosomales tienen este comportamiento ya que se sintetizan desde las 6 horas de germinación (tabla 4) pero cuya velocidad de síntesis se incrementa notablemente a las 24 horas. También se observó que un tratamiento de  $\alpha$ -amanitina no tiene efecto en la síntesis *de novo* de las PRAs lo que sugirió la presencia de mRNA en las semillas maduras, estos RNAm se pudieron detectar como más adelante se discute. Con todo esto podemos proponer un modelo de regulación para PRAs en la germinación:

Las PRAs se encuentran integradas al ribosoma de las semillas maduras, una vez que comienza la germinación estos ribosomas llevan a cabo la síntesis prioritaria de proteínas durante las primeras 6 horas. Se ha encontrado que las semillas de maíz también almacenan mensajes para otras proteínas ribosomales diferentes a las ácidas y tienen subpartículas ribosomales (Adriana Ortiz y Elda Beltrán, comunicación personal), estas subpartículas se empiezan a ensamblar a las 6 horas de germinación de aquí que se necesite la síntesis de nuevas proteínas ribosomales diferentes a las ácidas que serían exportadas al núcleo. Después de esto entre 6 y 24 horas se comienzan a sintetizar PRAs a partir de mensajes

almacenados en la célula para unirse a las nuevas subunidades que se exportan al citoplasma y de esta manera se incrementa la síntesis global de proteínas ribosomales (figura 4.3).

### 3) Expresión de las PRAs durante la germinación.

Con el hecho de que exista síntesis de proteínas a partir de mensajes almacenados hemos demostrado que el nivel de expresión de las PRAs durante la germinación ocurre a nivel de traducción y este constituye un punto en el cual la síntesis de estas proteínas pudiera ser regulado. Es probable que exista una discriminación para los mensajes de las PRAs ya que estos no se traducen en las primeras horas de germinación (tabla 3) a pesar de que la maquinaria de síntesis proteica está trabajando activamente, como lo pudimos constatar en la incorporación de metionina <sup>35</sup>S por las proteínas citoplásmicas (figura 4.3) desde las 3 horas de germinación.

### 4) PRAs en el citoplasma.

Este es un punto que requiere mayor investigación ya que en este trabajo no pudimos detectarlas en la fracción citoplásmica, solo encontramos bandas inespecíficas en los ensayos de Western blot (figura 4.2, carriles 2 y 4). Aparentemente se trata de proteínas diferentes a las PRAs por que no tienen un peso parecido al que encontramos en esta investigación ni tampoco al encontrado en las otras investigaciones realizadas en el laboratorio. Si bien es posible que se trate de proteínas con un determinante antigénico similar a las PRAs lo más probable es que el inóculo utilizado para inmunizar al conejo estaba contaminado con estas proteínas, que dicho sea de paso no se detectaron en el ribosoma en el Western blot. También es posible que el conejo halla sido inmunizado de manera natural por agentes que comparten determinantes antigénicos con las proteínas que aparecieron en la fracción citoplásmica. Otra prueba en favor de que las bandas de la fracción citoplásmica de la figura 4.2 no corresponden a las PRAs lo tenemos en el experimento de inmunoprecipitación. Al no observarse banda alguna en la fracción citoplásmica, podemos eliminar la posibilidad de

que las bandas inespecíficas encontradas en la fracción ribosomal se traten de las PRAs, pero no podemos decir que no existan PRAs en el citoplasma en estas etapas de la germinación, puesto que en experimentos anteriores se sugiere que existe una poza de estas proteínas. Es probable que la concentración sea demasiado pequeña para detectarlas, de cualquier manera este punto requiere más investigación. Por otro lado si esta poza no existiera nos aportaría nueva luz en relación al papel que tienen estas proteínas (PRAs) durante la síntesis de proteínas, ya que significaría que estas proteínas no requieren salir del ribosoma para llevar a cabo su función.

#### 5) Relación entre las proteínas y los transcritos encontrados.

Encontramos varias señales para PRAs en los ensayos de Northern blot lo que apoya la hipótesis de que existe mRNA almacenado para estas proteínas en las semillas maduras. Las señales que encontramos en los diferentes ensayos de Northern blot las podemos dividir en tres grupos según su tamaño. En el primer grupo encontramos una banda con una masa de unas 1195 bases, en el segundo grupo tenemos 2 ó 3 bandas en un intervalo de 660 a 760 bases y el tercer grupo corresponde a 3 bandas en el intervalo de 270 a 413 bases (figura 4.9). Si bien hasta no tener la secuencia de los aminoácidos de las PRAs y de estas señales no podemos decir que señal corresponde a qué proteína, por el tamaño podríamos pensar que la señal de 1195 bases corresponde al transcrito para P0 ya que es la proteína, dentro de las PRAs, de mayor tamaño y por que se han detectado algunos transcritos para P0 que tienen un tamaño de unas 1200 bases (Rich & Steitz, 1987) como ya he mencionado. De la misma manera es probable que las bandas entre 660 y 760 correspondan al mRNA que codifica para proteínas semejantes a P1. Las bandas en el intervalo de 413 a 270 bases son muy pequeños, pero pensando que cada triplete codifica para un aminoácido nos daría un péptido de 137 aminoácidos y otro de 90 aminoácidos respectivamente, P1 y P2 tienen una secuencia de 100 a 110 aminoácidos en varias especies, de modo que no estamos tan alejados en el tamaño, además ya he señalado que estos pesos pueden no ser exactos por



que usamos solo dos puntos de referencia. Por otro lado estas bandas son las que aparecen con mayor claridad en todos los ensayos debido a esto y a que la sonda que utilizamos corresponde a P2 de levadura (YP2) es probable que se traten de transcritos parecidos a P2 que es la proteína de menor masa molecular, dentro de las PRAs, que encontramos.

Es posible que las diferentes bandas que se ven en cada uno de los grupos correspondan a diferentes estados de maduración de un mismo transcrito, pero también es posible que existan más de tres PRAs en maíz, de tal manera que las diferentes bandas corresponderían a transcritos de genes diferentes. En levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) se han encontrado dos genes que codifican para 2 proteínas correspondientes al grupo de P1 (YP1 $\alpha$  y YP1 $\beta$ ) y dos genes que codifican para 2 proteínas correspondientes al grupo de P2 (YP2 $\alpha$  y YP2 $\beta$ ) (Bermejo et al, 1992). En *Trypanosoma cruzi* se han detectado 8 genes diferentes (Schijman and Levin, 1992), es posible que en plantas ocurra algo similar y que los genes se expresen dependiendo del tejido de que se trate y del estado de maduración.

Estos mensajes se buscaron en RNA total de ejes germinados 24 horas con un tratamiento de  $\alpha$ -amanitina y sin este tratamiento (figura 4.10). El hecho de que el mensaje tuviera una intensidad similar en ambos tratamientos puede significar que ambos ejes usan el mensaje para sintetizar PRAs pero al tener la misma cantidad significaría que no existe nueva síntesis de mRNA.

## VI.- CONCLUSIONES

Con el presente trabajo podemos decir varias cosas acerca de la expresión de las PRAs durante la germinación de en ejes de maíz:

En primer lugar que estas proteínas se encuentran unidas al ribosoma en la semilla madura, lo que nos hablaría del grado de madurez que tienen los ribosomas almacenados, ya que las PRAs son incorporadas a los ribosomas en el citoplasma -como una etapa final- a diferencia de el resto de las proteínas ribosomales que son incorporadas en el núcleo en etapas tempranas de la formación de los ribosomas.

En segundo lugar que sus mensajes se encuentran almacenados en la semilla madura y es apartir de estos mensajes que estas proteínas son sintetizadas en el período comprendido entre las 6 y 24 horas de germinación; esto sugiere una regulación a nivel traduccional de las PRAs. También podemos aportar una evidencia más de que existe un mecanismo de selección en la traducción de los mRNA por parte de los ribosomas, por que aun cuando los mensajes están, estas proteínas -y podría suceder lo mismo con otras proteínas ribosomales diferentes a las ácidas- no se sintetizan.

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

## **Bibliografía consultada:**

### **A**

- Adams, R., y Voorhees, V., 1941. *Org. Syn. Coll. Vol. 1*, 280.
- Ausubal, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K. *Current Protocols in Molecular Biology*; Geene Publishing Associates and Wiley Interscience. Unit 13.12 Vol. II; Preparation of Yeast RNA.
- Ausubal, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K. 1992 en *Short Protocols in Molecular Biology*; Geene Publishing Associates and Wiley Interscience. 2a. ed.
- Aviv H., Leder P.; 1972 *Proc. Natl. Acad. Sci.* **69**:1408-1415.

### **B**

- Benne, R., Amez, H., Hershey, J. W. B., Voorma, H. O. 1979. *J. Biol. Chem.* **254**:3201-3205.
- Benne, R., Hershey, J. W. B., 1978. *J. Biol. Chem.* **253**:3078-3087.
- Bermejo, B., Remacha, M., Ortiz-Reyes, B., Santos, C., Ballesta, J. P. G. 1993. *J. Biol. Chem.* **269**:3968-3975.
- Birnboim H.C., Doly J. 1979. *Nucl. Acids Res.* **7**:1513-1517.
- Borgese N., Gaetani J. 1980. *FEBS Lett.* **112**:216-220.
- Bradford M.M. 1976. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
- Brooker, J. D., Cheung, C. P., Marcus, A. 1977. In "The Physiology and Biochemistry of Seed Dormancy and Germination" (A.A. Khan, ed.), pp. 347-356. North-Holland Publishing Co., Amsterdam.
- Brostrom, C. O., Brostrom, M. A. 1990. *Annu. Rev. Physiol.* **52**:577-590.
- Brot, N., H. Weissbach. 1981. *Mol. Cell. Biochem.* **36**: 47-63.

### **C**

- Chooi, W. Y., Sabatini, L. M., Macklin, M., Praser, D. 1980 *Biochemistry* **19**:1425-1433.
- Clemens, M. J. 1984: Purification of eucariotic messenger RNA, en "Transcription and translation. A practical approach". Ed. Halmes B.D. y Higgins S.J.; IRL Press. p.32-38.

### **D**

- Dholakia, J. N., Wahba, A. J. 1989. *J. Biol. Chem.* **264**:546-550.
- Duncan, R., Hershey, J. W. B. 1984. *J. Biol. Chem.* **259**:11882-11889.
- Duncan, R., Hershey, J. W. B. 1987. *Mol. Cell Biol.* **7**:1293-1295.
- Duncan, R., Milburn, S. C., Hershey, J. W. B. 1987. *J. Biol. Chem.* **262**:380-388.
- Durán N., Bach M., Puigdoménech P., Palau J. 1984. *Mol. Immun.* **21**:231-236.

### **E**

- Eberhard, F., Manfred, W., 1988. *Plant Physiol.* **87**:562-565.
- Elkon, K. B., Skelly, S., Parnassa, A., Müller, W., Danho, W., Weissbach, H., and Brot, N. 1986. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**:7419-7423.
- Etchison, D., Smith, K., 1990. *J. Biol. Chem.* **265**:7492-7500.

### **F**

- Farrell, P. J., Hunt, T., Jackson, R. J. 1977. *Eur. J. Biochem.* **89**:517-521.
- Feinberg A.P., Vogelstein B. 1983. *Anal. Biochem.* **132**:6-13.
- Feinberg A.P., Vogelstein B. 1984. *Anal. Biochem.* **137**:266-270.

### **G**

- Gay, D. A., Sisodia, S. S., Cleveland, D. W. 1989. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:5763-5767.
- Gold, L. 1988. *Annu. Rev. Biochem.* **57**:199-233.
- Goumans, H., Thomas, A., Verthoeven, A., Voorma, H. O., Benne, R., 1980. *Biochim. Biophys. Acta* **608**:39-46.

Grolier., The New Grolier Encyclopedia. 1993. MPC versión. palabra clave corn.  
Gudkov, A.T., Gongazde, G.M., Bushuev, V.N., Okon, M.S. 1982. FEBS Lett. 138:229-232.

## H

Hamel, E., M. Koka, T. Nakamoto. 1972. J. Biol. Chem. 247: 805-814.  
Hershey, J. W. B. 1989. J. Biol. Chem. 264:20823-20826.  
Hershey, J. W. B. 1991. Annu. Rev. Biochem. 60:717-755.  
Horak, L., Schiffmann, D. 1977. Eur. J. Biochem. 79:375-380.  
Howard, G. A., Smith, R. L., Gordon, J. 1976. J. Mol. Biol. 106:623-637.

## I

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

## J

Janssen, G. M. C., Moller, W. 1988. J. Biol. Chem. 263:1773-1778.  
Juan-Vidalcs, F., Saenz-Robles, M.T., Ballesta, J.P.G. 1984. Biochemistry. 23:390-396.

## K

Koniczny, A., Safer, B. 1983. J. Biol. Chem. 258:3402-3408.  
Koren, E., Reichlin, M. W., Kosce, M., Fugate, R. D., Reichlin, M. 1992. J. Clin. Invest. 89:1236-1241.  
Kozak, M., 1989. A; J. Cell. Biol. 108:229-241.  
Kozak, M., 1989. B; Mol. Cell Biol. 9:5073-5080.  
Krulswijk, T., Planta, R. J. 1975. FEBS Lett. 58:102-105.

## L

Lawson, T. G., Lee, K. A., Maimone, M. M., Abramson, R. D., Dever, T. E., 1989. Biochemistry 28:4729-4734.  
Lavergne, J. P., Conquet, F., Reboud, J.P., Reboud, A. M. 1987. FEBS Lett. 216:83-88.  
Laemmli U.K. 1971. Nature 227: 680-686.  
Leader, D. P., Coia, A. A. 1977. Biochem. J. 162:199-200.  
Lewin, B. 1994. en Genes V. Oxford University Press. pág (ver texto).  
Logemas, F., Anal. Biochem. 163:16-20.

## M

Madrzak, C. J., Szybiak, U., Legoki, A. B. 1979. FEBS Lett. 103:304-307.  
Marcus, A. 1982. In "Nucleic Acids and Proteins in Plants II. Structure, Biochemistry and Physiology of Nucleic Acids" (B. Parthier and D. Boulter, eds), Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Vol. 14A, pp. 113-135. Springer-Verlag, Berlin.  
Marcus, A. Feeley, J., Volcani, T. 1966. Plant Physiol. 41:1167-1172.  
MacConnell, W. P., Kaplan, N. O. 1980. Biochem. Biophys. Res. Commun. 92:46-52.  
MacConnell, W. P., Kaplan, N. O. 1982. J. Biol. Chem. 257:5359-5366.  
Matheson, A. T., W. Möller, R. Amons, M. Yaguchi. 1980. In G. Chambliss, G.R. Craven (ed.). Ribosomes: estructure, function and genetics. University Press. Baltimore. p 297-332.  
Mesri E. A., Levitus, G., Hontebeyrie-Joskowicz, M., Dighiero, G., van Regenmortel, M. H.V., Levin, M. J. 1990. J. Clin. Microbiol. 28:1219-1224.  
Milburn, S. C., Duncan, R. F., Hershey, J. W. B. 1990. Arch. Biochem. Biophys. 276:6-11.  
Mitsui, K., Tsurugi, K. 1988. Nucleic. Acids. Res. 16:3574-3575.  
Möller, W., Slobin, L. I., Amons, R., Richter, D. 1975. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72:4744-4748.  
Morley, S. J., Traugh, J. A. 1989. J. Biol. Chem. 264:2401-2404.  
Murray, D. 1984. Seed Physiology. Vol. II. Academic. PRES.

## N

- Nairn, A. C., Palfrey, H. C. 1987. *J. Biol. Chem.* 262:17229-17303.  
Naranda, T., Remacha, M., Ballesta J. P. G. 1988. *J. Biol. Chem.* 263:9094-9101.  
Naranda, T., Ballesta, J.P.G. 1991. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88:10563-10567.  
Newton, C. H., Shimmin, L.C., Yee, J., Dennis, P.P. 1990. *J. Bacteriol.* 172:579-588.

## P

- Pain, V. M., Clemens, M. J. 1991. *Traslation in Eukaryotes*. Caldwell, NJ: Telford.  
Parrish, D. J., and Leopold, A. C. 1977. *Plant Physiol.* 59:1111-1115.  
Peterson, D. T., Safer, B., Merrick, W. C. 1979. *J. Biol. Chem.* 254:7730-7735.  
Pérez-Méndez, A., Aguilar, R., Briones, E., Sánchez-de-Jiménez, E. 1993. *Plant Science* 94:71-79.

## R

- Ray, B. K., Lawson, T. G., Kramer, J. C., Cladaras, M. H., Grifo, J. A., 1985. *J. Biol. Chem.* 260:7651-7658.  
Raychaudhuri, P., Chaudhuri, A., Maitra, U., 1985. *J. Biol. Chem.* 260:2140-2145.  
Remacha, M., Saenz-Robles, M. T., Vilella, M.D., Ballesta, J. P. G. 1988. *J. Biol. Chem.* 263:9094-9101.  
Remacha, M., Santos, C., Bermejo, B., Naranda, T., Ballesta, J. P. G. 1992. *J. Biol. Chem.* 267:12061-12067.  
Reyes, R., Vázquez, D., Ballesta, J.P.G. 1977. *Eur. J. Biochem.* 73:25-31.  
Rich, B. J., Steitz J.A. 1987. *Mol. Cell. Biol.* 7:4065-4074.  
Rowlands, A. G., Panniers, R., Henshaw, E. C. 1988. *J. Biol. Chem.* 263:5526-5533.  
Rozen, F., Edery, I., Mecrovitch, K., Dever, T. E., Merrick, W. C., Sonenberg, N. 1990. *Mol. Cell. Biol.* 10:1134-1144.  
Ryazanov, A. G. 1987. *FEBS Lett.* 214:331-334.

## S

- Saborio, J. L., Pong, S. S., Koch, G. 1974. *J. Mol. Biol.* 85:195-211.  
Saenz-Robles, M.T., Remacha, M., Vilella, M.D., Zinker, S., Ballesta, J.P.G. 1990. *Biochim. Biophys. Acta* 1050:51-55.  
Sánchez de Jiménez, E.; Aguilar, R.; (1984) *Plant Physiol.* 75:231-234.  
Sánchez de Jiménez, E.; Aguilar, R., López, S., (1981). *Biochem. and Bioph. Comm.* 2:445-450.  
Sanchez-Madrid, F., R. Reyes, P. Conde, Ballesta, J.P.G. 1979. *Eur. J. Biochem.* 98:409-416.  
Sanchez-Madrid, F., Juan-Vidales, F., Ballesta, J.P.G. 1981. *Biochemistry.* 20:3263-3266.  
Sanchez-Madrid, F., Juan-Vidales, F., Ballesta, J.P.G. 1981. *Eur. J. Biochem.* 114:609-613.  
Sandermann, Krüger, A., Kristiansen, K. J. 1979. *FEBS Lett.* 107:343-347.  
Santos, C., Ortiz-Reyes, B., Naranda, T., Remacha M., Ballesta J.P.G. 1993. *Biochemistry.* 32:4231-4236.  
Santos, C., Ballesta, J. P. G. 1994. *J. Biol. Chem.* 269:15689-15696.  
Scharf K. D., Nover L. 1982. *Cell* 30:427-437.  
Schijman, A. G., Levitus, G., Levin, M. J. 1992. *Immun. Lett.* 33:15-20.  
Schijman, A. G., Levin, M. J. 1992. *Nucleic Acids Res.* 20:2894  
Schneider, R. J., Shenk, T. 1987. *Annu. Rev. Biochem.* 56:317-312.  
Sen, S., Payne, P. I., Osborne, D. J. 1975. *Biochem. J.* 148:381-387.  
Shimmin, L. C., Ramírez, G. Matheson, A. T., Dennis, P.P. 1989. *J. Mol. Evol.* 29:448-462.  
Soto, M., Requena, J.M., García, M., Gomez, L. C., Navarrete, L., Alonso C. 1993. *J. Biol. Chem.* 268:21835-21843.  
Spiegel, S., Marcua, A. 1975. *Nature.* 256:228-230.  
Stoddart, J. L., Thomas, H. 1973. *Planta* 112:309-321.  
Stöffler, G., Wool, I. G., Lin, A., Rak, K. H., 1974. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71:4723-4726.

## T

- Thomas P.S. 1980. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77:5201-5205.

- Thompson, R. C.** 1988. *Trends Biochem. Sci.* 13:91-93.
- Towbin H., Stachlein T., Gordon J.** 1979. *Proc. Natl. Aca. Sci.* 76:4350-4354.
- Towbin, H., Ramjoué, H.P., Kuster, H., Liverani, D., Gordon, J.** 1982. *J. Biol. Chem.* 257:12709-12715.
- Trachsel, H., Erni, B., Schreier, M. H., Stachelin, T.** 1977. *J. Mol. Biol.* 116:755-767.
- Traut, R.R., Lambert, J.M., Kenny, J.W.** 1983. *J. Biol. Chem.* 258: 14592-14598.
- Tsurugi, K., Ogata, K.** 1985. *J. Biochem.(Tokyo)* 98:1427-1431.
- Tuazon, P. T., Merrick, W. C., Traugh, J. A.** 1989. *J. Biol. Chem.* 264:2773-2777.
- Tuazon, P. T., Morley, S. J., Dever, T. E., Merrick, W. C., Rhoads, R. E. Traugh, J. A.** 1990. *J. Biol. Chem.* 265:10617-10621.

## U

- Uchiumi, T., and Komiami, R.** 1992. *J. Biol. Chem.* 267:19179-19185.

## V

- van Agthoven, A. J., Maassen, J. A., Möller, W.** 1977. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 77:989-998.
- van Agthoven, A., Krick, J., Amons, R., Möller, W.** 1978. *Eur. J. Biochem.* 91:553-556.
- van der Krol A. R., Mol, J. N. M., Strulje, A. R.** 1989. *Bio techniques* 6:958-976.

## W

- Waggoner, P. E., Parlange, J. Y.,** 1976. *Plant. Physiol.* 57:153-156.
- Warner, J. R., Mitra, G., Schwindinger, W. F., Studeny, M., Fried, H. M.** 1985. *Mol. Cell. Biol.* 5:1512-1521.
- Warner, J. R.** 1989. *Microbiol. Rev.* 53:256-271.
- Weil, J. H., Partier, B.** 1982. in "Nucleic Acids and Proteins in Plants II. Structure, Biochemistry and Physiology of Nucleic Acids" (B. Parthier and D. Boulter, eds), *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Vol. 14B*, pp. 65-112. Springer-Verlag, Berlin.
- Welsbach, H.** 1980. In G. Chambliss, G.R. Craven (ed.). *Ribosomes: estructure, function and genetics.* University Press. Baltimore. p.377-411.
- Wittman, H. G.** 1974. en *Ribosomes* (Nomura, M., Tissieres, A., and Lengyel, P. eds). Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Speing Harbor. N.Y. p.93-114.
- Wool, I. G., Chan, Y. L., Glück, A., and Suzuki, K.** 1991. *Biochemie.* 73:861-870.

## Z

- Zinker, S.** 1980. *Biochim. Biophys. Acta* 606:76-82.
- Zinker, S., Warner, J. R.** 1976. *J. Biol. Chem.* 251:1799-1807.

## APENDICE

### Método para reutilizar las membranas ya hibridadas.

La membrana se lavó para quitar toda la marca y reutilizarla en posteriores hibridaciones. Para ello la membrana se depositó en SDS al 0.5 % hirviendo y se dejó enfriar a temperatura ambiente dentro de la solución.

**Observaciones:** En algunos casos las membranas se tiñeron para visualizar el RNA con una solución de azul de metileno 0.02 % en acetato de Na 0.3 M a pH 5.5 y se destiñeron con cuidado en etanol al 20 %. Después de este procedimiento las hibridaciones resultaron con la misma eficiencia.

MEDIO DE MURASHIGE Y SKOOG (1962)

NOMBRE DEL COMPUESTO	FORMULA	PESO MOLE CULAR (g)	CANTIDAD POR LITRO			
			EN PESO	EN MOLES		
a) Macronutrientes ( $\mu\text{mol. L}^{-1}$ )						
Nitrato de Amonio	$\text{NH}_4 \text{NO}_3$	80.04	1650	mg	20.6	m mol
Nitrato de Potasio	$\text{KNO}_3$	101.108	1900	"	18.8	"
Cloruro de Calcio	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	147.02	440	"	2.99	"
Sulfato de Magnesio	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246.48	370	"	1.50	"
Posfato de Potasio Monobásico	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	136.09	170	"	1.25	"
b) Micronutrientes ( $\mu\text{mol. L}^{-1}$ )						
Acido Bórico	$\text{H}_3\text{BO}_3$	61.83	6.2	"	100.00	$\mu\text{mol.}$
Sulfato de Manganeso	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	223.0	22.3	"	100.00	"
Sulfato de Zinc	$\text{Zn SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	287.54	8.6	"	29.90	"
Yoduro de Potasio	$\text{KI}$	166.01	0.83	"	5.00	"
Molibdato de Sodio	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	241.95	0.25	"	1.03	"
Sulfato de Cobre	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	249.68	0.025	"	0.100	"
Cloruro de Cobalto	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	237.93	0.025	"	0.105	"
c) Micronutrientes ( $\mu\text{mol. L}^{-1}$ )						
Sulfato de Hierro	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	278.028	27.8	"	100.00	"
Ethylenediaminetetra acetic disodium	$\text{C}_{10} \text{H}_{14} \text{N}_2 \text{O}_{10} \text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	372.30	37.3	"	100.00	"
d) Fuente de carbono ( $\text{mmol L}^{-1}$ )						
Sucrosa	$\text{C}_{12} \text{H}_{22} \text{O}_{11}$	342.31	30.0	gr.	87.6	mmol.
e) Hormonas ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )						
Acido Indol Acético AIA	$\text{C}_{10} \text{H}_9 \text{O}_2 \text{N}$	175.18	1.30	mg.	5.71	171 $\mu\text{mol}$
Kinetina K	$\text{C}_{10} \text{H}_9 \text{N}_5\text{O}$	215.21	0.04-10	mg.	0.186-46.5	"



f) Otros Factores de Crecimiento ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )					
Inositol	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	180.16	100.0	mg.	555 $\mu\text{mol}$ .
Acido Nicotínico	$\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$	123.11	0.5	"	4.06 "
Piridoxina HCl	$\text{C}_8\text{H}_{11}$	205.64	0.5	"	2.43 "
Tiamina HCl	$\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_5\cdot\text{H}_2\text{O}$	337.27	0.1	"	0.296 "
g) Aminoácidos ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )					
Glicina	$\text{H}_2\text{NCH}_2\text{COOH}$	70.07	2.0	"	26.6 "
g) Sybstancias no definidas (ml. g. mg. $\text{L}^{-1}$ )					
Caseina hidrolizada			1	gr.	1 gr.
i) Agar ( $\text{g L}^{-1}$ ) <sup>1</sup>			10	"	10 "

FALLA DE ORIGEN