



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

46

FACULTAD DE QUÍMICA

“Caracterización del grado de fosforilación de las
proteínas ribosomales ácidas P1 y P2 de ejes embrionarios
de maíz.”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A

VERÓNICA MUÑOZ OCOTERO



MÉXICO, D.F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

2002



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	Profa. Estela Sánchez de Jiménez
Vocal	Prof. Rogelio Rodríguez Sotres
Secretario	Prof. Victor Manuel Ugalde Saldivar
1er suplente	Profa. Ma. Elena Ibarra Rubio
2do suplente	Prof. Alfredo Salazar Zazueta

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Laboratorio 103. Departamento de Bioquímica. División de Bioquímica y Farmacia.
Conjunto "E" Facultad de Química. UNAM.

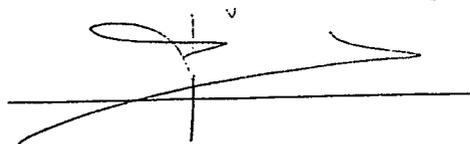
Asesor del tema:

Dra. Estela Sánchez de Jiménez



Supervisor Técnico:

M.C. Raúl Genaro Aguilar Caballero



Sustentante:

Verónica Muñoz Ocotero



ABREVIATURAS

PRA _s	Proteínas ribosomales ácidas
PRA	Proteína ribosomal ácida
P1	Proteína eucariote ácida 1
P2	Proteína eucariote ácida 2
CKII	Cinasa Kasein II
PK60S	Protein Kinasa 60 Subunit
eEF	Factor de elongación eucariote de la síntesis de proteínas
ATP	Adenosin trifosfato
ARN	Ácido ribonucleico
rARN	Ácido ribonucleico ribosomal
mARN	Ácido ribonucleico ribosomal mensajero
tARN	Ácido ribonucleico ribosomal de transferencia
³² P	Isotopo radiactivo de fósforo
N-terminal	Amino terminal
C-terminal	Carboxilo terminal
kDa	Kilodalton
pI	Punto isoeléctrico
PVDF	Difluoruro de polivinilo
Ac	Acetato
SDS	Dodecil sulfato de sodio
EGTA	Etilenguanosil tetra acetato
EDTA	Etilenglicol-bis-(β-amino-etileter)N,N'-tetra-acetic-acid
SN	Sobrenadante
Rf	Referencia de distancia recorrida
RPM	Revoluciones por minuto
DO	Densidad óptica
IEF	Isoelectroenfoque
Ti	Titanio
MS	Murashige & Skoog (medio)
TBS	Tween Base Salt
DTT	Ditiotreitol
PMSF	Phenylmetil-sulfonil-fluoride
PTE	Polioxietilen-10-tridecil-eter
HEPES	(N-[2-hidroxietyl]piperazin-N'-[2-etansulfonic-acid])

ÍNDICE

I.	RESUMEN	1
II.	INTRODUCCIÓN	2
III.	ANTECEDENTES	3
IV.	METODOLOGÍAS	13
	Material biológico	
	Obtención de ribosomas	
	Obtención de polisomas	
	Aislamiento de proteínas ribosomales ácidas (PRAs)	
	Electroforesis-SDS de proteínas ribosomales ácidas (PRAs)	
	Curva de calibración de masa molecular	
	Separación de PRAs a partir de geles de poliacrilamida	
	Análisis por Western blot	
	Isoelectroenfoque (IEF)	
	Desfosforilación con fosfatasa alcalina	
	Identificación de residuos de aminoácidos fosforilados (inmunodetección)	
V.	RESULTADOS	18
	Extracción y purificación de ribosomas de ejes embrionarios de maíz	
	Patrón electroforético de proteínas ribosomales ácidas (PRAs)	
	Purificación y separación de las proteínas ribosomales ácidas (PRAs)	
	Caracterización de las proteínas ribosomales ácidas (PRAs)	
	Determinación de las formas fosforiladas de las proteínas ribosomales ácidas	
	Patrón electroforético de proteínas ribosomales ácidas provenientes de las fracciones polisomal y no polisomal	
	Identificación de residuos de aminoácidos fosforilados (inmunodetección)	
VI.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	32
VII.	CONCLUSIÓN	35
VIII.	BIBLIOGRAFÍA	36
IX.	ANEXO	
	A. Composición de soluciones	40
	B. Obtención de polisomas y no polisomas	41

I. RESUMEN

La síntesis de proteínas en semillas en germinación es un mecanismo indispensable para su supervivencia y, junto con otros procesos metabólicos, aseguran el desarrollo de una nueva plántula. La síntesis de proteínas se lleva a cabo en los organelos llamados ribosomas. En la estructura de cada ribosoma se encuentran dos proteínas de carácter ácido denominadas P1 y P2, las cuales tienen la capacidad de fosforilarse y desfosforilarse y así contribuir a regular la producción de proteínas en el período de la germinación, cuya duración aproximada es de 24 h. Este último proceso se considera el paso limitante para el establecimiento de una nueva planta. Las proteínas ribosomales ácidas (PRAs) de ejes embrionarios de maíz son péptidos de baja masa molecular 14.5 y 16 kDa. Trabajos previos muestran la funcionalidad de estas proteínas en la elongación del péptido que se sintetiza, sin embargo, se desconoce hasta donde esta función depende del grado de fosforilación que tienen las proteínas ácidas.

El objetivo de este trabajo es caracterizar las proteínas ribosomales ácidas P1 y P2 de ejes embrionarios de maíz germinados 24 h con base a su masa molecular, punto isoeléctrico y grado de fosforilación.

Para conseguir lo anterior se optimizaron técnicas para la extracción de PRAs por el método de 1.5 M NH_4Cl / 50 % Etanol, partiendo de ribosomas puros, así como para el aislamiento de los péptidos ácidos de estos organelos por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida.

Los resultados mostraron que los péptidos de 14.5 y de 16 kDa, una vez separados e identificados por inmunofluorescencia, corresponden a P2 y P1 respectivamente, siendo P1 más ácido (pI 4.2) que P2 (pI 4.5), esto se determinó analizando los péptidos purificados por medio de isoelectroenfoque en un intervalo de pH de 2.5 a 5. Así mismo se encontró un diferente grado de fosforilación entre ellos, la proteína P2 posee dos grados de fosforilación, mientras que la P1 sólo uno, ambos están fosforilados en residuos de serina.

En una cinética de fosforilación *in vivo*, se determinó que las primeras proteínas fosforiladas que aparecen entre los 40 y 255 minutos pertenecen al péptido P2 y es, hasta los 255 minutos, cuando aparece la P1 fosforilada. Mientras, en la cinética de desfosforilación con fosfatasa alcalina el péptido P1 es el primero y más accesible a la desfosforilación.

También *in vivo* se encontró por isoelectroenfoque de la fracción polisomal, en los ejes embrionarios de maíz con 24 h de germinación, el péptido P1 está presente en estado desfosforilado y fosforilado en mayor concentración que P2 en sus dos estados. Además P1 y P2 desfosforiladas se encuentran disminuidas al término de la germinación con respecto al contenido de ellas en el tiempo cero (estado quiescente). Lo anterior sugiere un proceso activo de fosforilación de las proteínas ribosomales ácidas, mayor para P2 que para P1, al final de la germinación e inicio del crecimiento de la plántula, lo que correlaciona con el incremento en la velocidad de síntesis de proteínas durante la germinación.

II. INTRODUCCIÓN

Una de las especies de gramíneas más importantes desde el punto de vista alimenticio, cultural y económico es el maíz, cuyo nombre científico es *Zea mays* L. El maíz es una planta monocotiledónea perteneciente a la familia *Gramineae*, cuya característica más importante es el reproducirse a través de semillas, plantas en potencia, que transportan el material genético de una generación a otra mediante eventos metabólicos que ocurren durante la germinación (SEP,1990).

La germinación representa un proceso biológico de gran interés, ya que si este no se efectúa correctamente no será posible obtener plantas y semillas nuevas y se perdería la perpetuación de la especie. Las plantas que económicamente son de mayor relevancia se cultivan a partir de semillas y esto lleva a la necesidad de tener conocimiento sobre la fisiología de germinación, así como de los mecanismos moleculares que se ven involucrados en ésta (Camacho,1995).

La respiración, actividad enzimática, síntesis de proteínas y de ácidos ribonucleicos (ARN) son eventos fundamentales en la germinación, íntimamente involucrados en la preparación para el posterior crecimiento de la plántula (Bewley & Black, 1994).

La síntesis de proteínas es uno de los procesos bioquímicos más importantes en la germinación, el principal componente involucrado en este proceso es el ribosoma. En este sitio físico es donde se reúnen los componentes que participan en la síntesis de las proteínas. El ribosoma en todos los organismos posee una gran semejanza estructural, que refleja quizá la universalidad de sus funciones básicas (Wool, 1979; Lake, et. al., 1982; Hill, et. al., 1990; Wittmann-Liebold et. al., 1990; Liljas, 1991; Clemons, et., al., 1999; Nissen, et., al., 2000).

Se ha visto que ciertas proteínas ribosomales de carácter ácido (PRAs), denominadas P1 y P2 en eucariotes, se encuentran fosforiladas y son necesarias para llevar a cabo un aspecto del proceso de traducción en el ribosoma. Se sabe que son las proteínas ácidas fosforiladas las que favorecen mayor velocidad de elongación del péptido en formación (Mc Conel & Kaplan,1982). Se les ha estudiado en células de organismos pertenecientes a todos los reinos biológicos y los modelos en eucariotes abarcan desde las levaduras hasta mamíferos; sin embargo los estudios en plantas han sido poco extensos (Suárez,1995)

Considerando la presunta relevancia de la fosforilación de las proteínas ácidas ribosomales, se plantea en este trabajo identificar individualmente el grado de fosforilación de las proteínas ribosomales ácidas P1 y P2 en ribosomas de ejes embrionarios de maíz, en el período de germinación, cuya duración es de 24 horas aproximadamente.

III. ANTECEDENTES

EL MAÍZ (*Zea mays* L.)

El maíz es una planta monoica de cultivo anual y con un período vegetativo relativamente corto. Después de la fecundación, cada ovario se transforma en fruto (cariópside), que lleva en su interior una sola semilla, la cual contiene sustancias de reserva en su endospermo y en la parte basal al embrión. En México, las miles de variedades de maíz dispersas en su territorio se han agrupado en 30 razas clasificadas (Reyes, 1990) pueden dividirse en 5 grupos principales como sigue:

- a) Indígenas antiguas: Palomero toluqueño, Arrocillo amarillo, Chapalote y Nal-Tel.
- b) Exóticas Pre-colombinas: Cacahuacintle, Harinoso de ocho, Olotón y Maíz dulce.
- c) Mestizas prehistóricas: Cónico, Reventador, Tabloncillo, Tehua, Tepecintle, Comiteco, Jala, Zapalote chico, Zapalote grande, Pepitilla, Olotillo, Tuxpeño y Vandefío.
- d) Modernas incipientes: Chalqueño, Celaya, Cónico norteño y Bolita.
- e) Serranas occidentales: Tablilla de 8, Bofo, Gordo, Azul y Apachito.

La composición química del maíz es variable y está relacionada con: estadio, raza, variedad, tecnología del cultivo y clima. En general, el maíz tiene un alto valor nutritivo como fuente de energía, por su gran contenido de carbohidratos, pero por su aporte proteico ya que no posee las suficientes proteínas, tanto en cantidad como en calidad y es deficiente de dos aminoácidos esenciales: lisina y triptófano; además es insuficiente en la vitamina niacina y en minerales, excepto en calcio.

La estructura de la semilla de maíz está conformada por la testa, el endospermo y embrión (Reyes, 1990; Fig. 1A). Cada una de las tres partes del grano cumple una función definida (Fig. 1B). La testa, también llamada pericarpio, protege a la semilla tanto antes como después de la siembra, limitando o impidiendo la entrada de organismos patógenos que podrían invadir los tejidos de la semilla. Si el pericarpio resulta dañado, tal vez la germinación se torne más lenta o nula, pues los hongos pueden invadir a la semilla en germinación y utilizar las reservas alimenticias antes del afianzamiento de la plántula.

El endospermo es la principal reserva energética de la semilla y está compuesto por un 90% de almidón y 7% de proteína con pequeñas cantidades de aceites minerales y otros componentes químicos. Su función principal consiste en proporcionar nutrimentos a la plántula hasta que sus raíces estén bien aseguradas y sus hojas fotosinteticen carbohidratos en cantidades suficientes para satisfacer los requerimientos de su vida y crecimiento.

El embrión está formado por el eje embrionario y el escutelo, éste último contiene un alto porcentaje de aceite (35 - 40%) y sustancias importantes en las etapas iniciales de la

germinación, es un tejido que no crece ni se divide y sirve para transportar las reservas del endospermo hacia el eje embrionario.

El eje embrionario está conformado por el hipocotilo (que da origen a la hoja embrionaria con su cubierta llamada coleóptilo), la radícula y la coleorriza, y tiene como función biológica producir una nueva planta bajo condiciones ambientales apropiadas para el crecimiento y diferenciación de sus tejidos (Mayer, 1989).

La semilla de maíz puede mantener su capacidad de germinación o viabilidad, si se le proporciona el medio adecuado que favorezca su reactivación. Entre las condiciones necesarias para la germinación está el suministro de agua, temperatura y composición gaseosa de la atmósfera, apropiadas a este tipo de semilla.

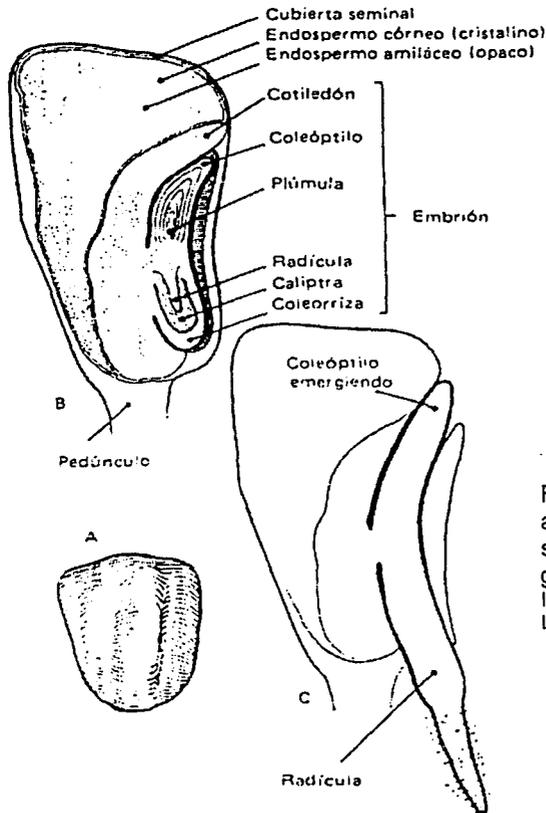


Figura 1. Anatomía de una semilla de maíz: A, aspecto externo; B, esquema de las partes de la semilla sin germinar; C, esquema de la semilla germinada. Tomado de R.H. Amett, Jr. Y D.C. Braungart: An Introducción to Plant Biology, 3ª edición. The C.V. Mosby Co., St. Louis, 1970.

PROCESO DE GERMINACIÓN

Aunque no es fácil definir la germinación, generalmente se considera que es el proceso que comprende desde el inicio de la imbibición de la semilla hasta cuando una parte del embrión, generalmente la radícula, protruye a través de la cubierta o testa de la semilla (Bidwell, 1979; Fig. 1C). En la imbibición se suceden tres etapas confluentes para la germinación: primero, hay una toma rápida de agua; segundo, se presenta una hidratación y solvatación de las macromoléculas y organelos preexistentes, los cuales han sido previamente formados durante el desarrollo de la semilla y almacenados o inactivados por el proceso de deshidratación cuando las semillas completan su maduración; tercero, se establece la respiración que propicia la formación de trifosfato de adenosina (ATP), el cual provee la energía para la síntesis de sustratos, coenzimas y proteínas (enzimas), los cuales son necesarios para iniciar las actividades anabólicas de los tejidos (Aguilar, 1985).

EL RIBOSOMA Y LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS

La síntesis de proteínas está ausente en la semilla seca, pero minutos después de iniciada la imbibición comienza a darse. En ejes embrionarios de maíz, la síntesis de proteínas al principio de la germinación, se basa principalmente en los mRNA almacenados, ribosomas preformados y componentes bioquímicos y estructurales necesarios para este proceso (Sánchez de Jiménez, et. al., 1999).

El inicio de la actividad metabólica, involucra la activación secuencial de las funciones de los organelos tales como los ribosomas, parte fundamental de la maquinaria celular que lleva a cabo la síntesis de proteína (Brooker, et. al., 1977). Los ribosomas, que catalizan la síntesis de proteínas, consisten de 3 a 4 moléculas de ácido ribonucleico ribosomal (rARN) y más de 90 proteínas ensambladas en las subunidades grande y pequeña (Fig. 2). Ribosomas procariones y eucariotes han sido investigados, con gran énfasis en los ribosomas de eucariotes rata y levadura (Wool et. al., 1991; Warner, 1989) y en menor detalle se ha analizado los ribosomas de plantas (Bailey-Serres, 1998).

La estructura y función del ribosoma eucariote se considera altamente conservado (Wool, 1979). La subunidad ribosomal pequeña de animales, hongos y plantas son muy similares en masas moleculares, mientras que la masa de la subunidad grande es muy variable. La subunidad grande de plantas tiene una menor masa molecular que en la rata o la levadura (Bielka, 1982; Bailey-Serres, 1998) debido a las diferencias en la secuencia de nucleótidos en el rARN y por la heterogeneidad en la composición de proteínas ribosomales.

Uno de los dominios del ribosoma mejor caracterizado y de relevancia funcional es el tallo ribosomal, el cual se localiza en la subunidad grande del ribosoma (Lehninger et. al., 2000), el cual participa en el sitio activo del ribosoma donde suceden las interacciones entre mRNA, tARN y factores de traducción durante el final de la etapa de iniciación, en la etapa de elongación y terminación de la traducción (Möller, 1990).

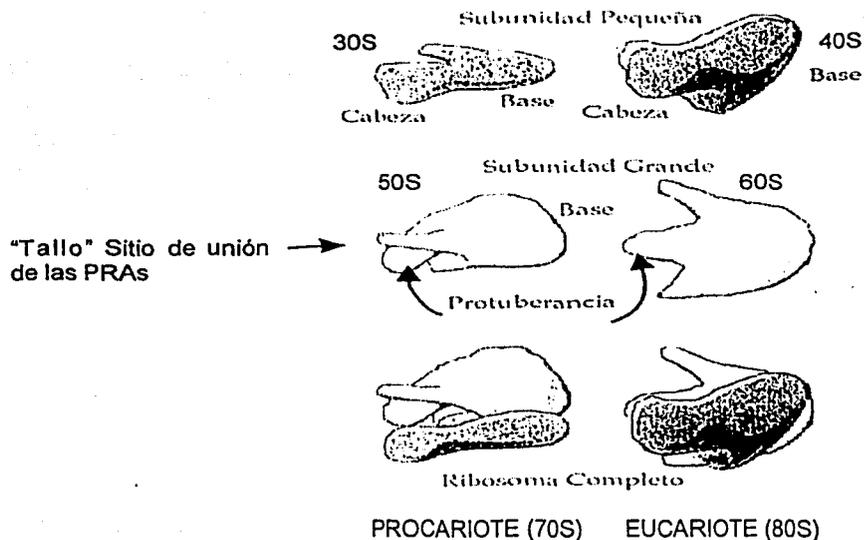


Figura 2. El ribosoma y sus subunidades. (Suárez, 1995)

El tallo está formado por un complejo proteico pentamérico, en los procariotes se conforma de una copia de la proteína ribosomal L10 (17 kDa) y 2 heterodímeros de las proteínas ribosomales ácidas L7 (12 kDa) y L12 (12 kDa) (Peterson, et. al., 1976), L12 es la misma que L7 pero acetilada en el extremo amino terminal; L10 interactúa con el dominio del N-terminal a una región altamente conservada de rARN llamado centro GTPasa (Uchiumi, et. al., 1991), mientras el dominio carboxilo interactúa con las proteínas L7 y L12 formando la punta del tallo.

En eucariotes, este complejo está formado por P0 (34 kDa), la proteína equivalente a L10, y las proteínas ribosomales ácidas P1 y P2 (11 - 12 kDa) equivalentes a L7 y L12 (Uchiumi, et. al., 1987; Rich & Steitz, 1987; Wool, et. al., 1991; Vangala & Bailey-Serres, 1995; Ballesta & Remacha, 1996). Las proteínas ribosomales ácidas de eucariotes han sido llamadas

genéricamente como proteínas P porque se encuentran fosforiladas en el ribosoma (Zinker & Warner, 1976; Kudlicki, et. al., 1976; Lin, et. al., 1982; Juan-Vidales, et. al., 1984) y desfosforiladas en el citoplasma. Se dividen en las familias P1 y P2 como se ha hecho mención (Zinker, 1980; Mitsui & Tsurugi, 1988). Mientras en procariotes no se han encontrado fosforiladas y son generalmente llamadas proteínas A (ácidas / ricas en alanina; di Giuseppe, et. al., 1999).

A las proteínas ácidas del ribosoma se les ha denominado de diferente manera dependiendo del organismo en estudio (Tabla 1).

Tabla 1. Proteínas ribosomales ácidas. Nomenclatura y pesos moleculares asignados a las proteínas ácidas del ribosoma dependiendo del organismo de origen. (Pettersson, 1976; Lin, 1982; Prieto, 1991 y Wool, 1991; Naranda y Ballesta, 1991; Qian, 1987; Olson, 1993; Gagou, 1999)

Mamífero (hígado de rata)	<i>D. melanogaster</i>	<i>Ceratitis capitata</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>E. Coli</i>
P1 11,490 Da	rPA1 17,000 Da	CcP1 17,000 Da	YP1 α 10,947 Da	L7 12,000 Da
P2 11,684 Da	rPA2 15,000 Da	CcP2 15,000 Da	YP2 α 10,742 Da	L12 12,000 Da

Eucariotes superiores poseen un tipo de P1 y P2, mientras en eucariotes inferiores poseen múltiples formas de P1 y P2. Tal vez mayores requerimientos para adaptabilidad metabólica puede ser el inicio de tal expansión (Zurdo, et. al., 2000).

CARACTERÍSTICAS DE LAS PROTEINAS RIBOSOMALES ÁCIDAS

Estas proteínas son únicas entre las ribosomales, debido a su punto isoeléctrico (pI) ácido y por ser las únicas en existir en multicopias en el ribosoma. Así que en mamíferos se han encontrado 2 proteínas ribosomales ácidas, en plantas 3 y en eucariotes menores, tal como *S. cerevisiae* tiene 4 diferentes proteínas (Tchórzewski, et. al., 2000).

Las proteínas eucariotes P1 y P2 muestran propiedades similares con las proteínas procariotes L7 y L12, forman un pentámero que constituye el tallo de la subunidad grande, son péptidos de baja masa molecular, tienen pI bajos y juegan un papel esencial en la interacción con los factores de elongación y con los factores dependientes de la actividad GTPasa (MacConnell & Kaplan, 1982). Aunque comparten características entre ellas, existen diferencias importantes,

en las proteínas ribosomales ácidas eucariotes, P1 y P2 son codificadas por genes independientes (y aún así es muy notable la similitud que guardan en su secuencia de aminoácidos), mientras que L7 y L12 son codificadas por uno sólo; también muestran diferencias estructurales, especialmente en el dominio amino terminal, el cual es la parte de las proteínas involucrada en la interacción con el ribosoma (Ballesta, et. al., 1999). Otra característica que distingue PRAs eucariotes de procariotes es que las eucariotes se encuentran fosforiladas en el ribosoma y pueden ser fosforiladas *in vitro* por varias proteínas cinasas incluyendo a la CKII, PK60S y una familia de PRA proteínas cinasas (Tchórzewski, et. al., 2000). Una proteína cinasa específica para PRAs fue encontrada unida a la subunidad 60S de ribosomas de ejes de maíz (Sepúlveda, et. al., 1995), la subunidad donde las PRAs están ensambladas. Esta cinasa PRA ha demostrado fosforilar eficientemente *in vitro* a PRAs ensambladas en el ribosoma. *Tetrahymena pyriformis* es la única excepción encontrada entre los estudios hechos en eucariotes que no tiene sus proteínas ácidas y P0 fosforiladas (Sandermann, et. al., 1979).

Las proteínas P1 y P2 presentes en el ribosoma pueden intercambiarse por las P1 y P2 citoplásmicas que se encuentran desfosforiladas (Zinker & Warner, 1976; Elkon, et. al., 1986; Ballesta & Remacha, 1996). Como una consecuencia de este intercambio la cantidad de las proteínas P1 / P2 unidas al ribosoma cambia con la actividad metabólica de las células tal y como se reporta en *Ceratitis capitata* en el que el patrón de fosforilación de las proteínas ácidas no es el mismo en tres diferentes estados celulares de desarrollo (sexto día de larva, pupa blanca y embriones de 0 a 2 días). En este caso los dos grupos de proteínas corresponden a formas multifosforiladas de P1 y P2 eucariotas (Kouyanou, et. al., 1998).

Contrario a L7 / L12, las cuales están bien estructuradas (Leijonmarck, et. al., 1980), en su dominio carboxilo terminal, las proteínas P1 y P2 carecen de una estructura terciaria estable cuando están libres en solución por lo que tienden a una conformación semejante a la de globulo fundido (*molten globule*) (Zurdo, et. al., 1997).

FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS RIBOSOMALES ÁCIDAS

Las proteínas del tallo muestran ser un caso relevante de péptidos desplegados. La flexibilidad parece ser un importante requerimiento para la función de las proteínas ribosomales ácidas P para hacerlas capaces de interactuar con diferentes regiones ribosomales (Zurdo, et. al., 2000). De hecho, la movilidad de estos componentes del tallo en procariotes así como en ribosomas de eucariotes ha sido confirmado experimentalmente por resonancia magnética nuclear. (Cowgill, et. al., 1984).

P0, aunque tiene la capacidad de fosforilarse, no es una proteína ribosomal ácida, sin embargo es necesaria para la unión de P1 y P2 al ribosoma y formar la punta del tallo. El ensamblado de las proteínas ribosomales ácidas para formar el tallo es un proceso ordenado que probablemente no sea idéntico *in vivo* e *in vitro* (Zurdo, et. al., 2000). Se ha demostrado que las alteraciones en la composición del tallo ribosomal afecta el patrón de expresión de proteínas por la célula (Remacha, et. al., 1995), el nivel de fosforilación que haya en el tallo puede así mismo afectar el proceso de traducción, causando una alteración en la expresión de mARNs específicos. Esto puede producir importantes efectos en algunas rutas metabólicas en las cuales la concentración relativa de los componentes varios es crítico para el propósito final (Ballesta, et. al., 1999).

El mecanismo mediante el cual el tallo afecta la traducción aún se desconoce, aunque se sabe que actúa durante la elongación, lo que sugiere que los cambios de su estructura por la composición o fosforilación que ocurra, puede afectar la eficiencia de traducción del ribosoma. Aún no se conoce lo significativo que resulte la característica de fosforilación en la función de las proteínas ribosomales ácidas (Bargis-Surgey, et. al., 1999). Se ha considerado a la fosforilación de estas proteínas, así como de factores de iniciación y elongación, relevante por participar en el control traduccional de mRNA en diferentes tipos de células eucariotes (Palen & Traugh, 1987; Hershey, 1991).

Se sabe que la fosforilación de P1 y P2 no es necesaria para su unión al ribosoma, ya que se incorporan desfosforiladas y es entonces cuando se fosforilan (Aguilar et. al., 1998). La fosforilación de P2 es necesaria para poder interactuar con el factor de elongación eucariote eEF-2 aún si P1 se mantiene desfosforilada, esta interacción no persiste al fosforilarse P1 y desfosforilarse P2. A lo anterior se añade un dato reciente que indica que la fosforilación puede afectar la interacción de la proteína con el factor de elongación eEF-2 (Vard, et. al., 1997), sugiriendo que las proteínas desfosforiladas podrían afectar la actividad del ribosoma después de unírsele. En levadura la presencia de P1 fue requerida para ensamblar a P2 en el ribosoma (Remacha, et. al., 1992), también se ha indicado que P1 tiene una gran afinidad para unirse a eEF-2, pero la fosforilación de ambas proteínas estabiliza la interacción de eEF-2 con el ribosoma (Zurdo, et. al., 2000). La interacción entre eEF-2, P1/P2 y sus derivados fosforilados es específica, ya que cuando P1 y P2 son reemplazadas por otras proteínas de masa molecular similar dan resultados negativos (Bargis-Surgey, et. al., 1999). P1 y P2 y sus formas fosforiladas parecen ser funcionalmente distintas.

Estos datos, junto con el hecho de encontrar a las proteínas ácidas desfosforiladas en el citoplasma (Zinker, 1980), apoyan fuertemente la idea de que la fosforilación es importante para la estructura y función del tallo ribosomal (Zurdo, et. al., 1997).

Los sitios de fosforilación de las proteínas que forman el tallo ribosomal han sido estudiados sólo en algunos casos. Tres posiciones han sido detectadas en proteínas P1 / P2 de rata (Lin,

et. al., 1982), pero sólo uno en *Artemia salina* (serina posición 98; van Agthoven, et. al., 1978) y en *Saccharomyces cerevisiae* (serina posición 96; Sánchez-Madrid, et. al., 1981; Juan-Vidales, et. al., 1984), en ejes embrionarios de maíz se encontró el aminoácido serina como probable residuo fosforilado (Briones, 1993). En todos los casos en donde se ha estudiado, la fosforilación tiene lugar en residuos de serina cercanos al carboxilo terminal, dado que esta región se ha conservado en la evolución, es posible que el residuo de serina equivalente esté fosforilado en la mayoría de las proteínas P eucariotas, incluyendo plantas.

Estudios de mutaciones en levadura han comprobado que la fosforilación ocurre en un residuo de serina cercana al carboxilo terminal de las proteínas P. La modificación en este residuo de serina no afecta la formación del tallo ni la actividad del ribosoma en condiciones normales, aunque induce una osmorregulación relacionada al fenotipo a 37 °C (Ballesta, et. al., 1999).

Es indudable que estas proteínas juegan una función en el ribosoma y que podría ser relacionado a la modulación de la actividad ribosomal. La existencia de diferentes formas de éstas proteínas en los organismos es compatible con esta teoría (Sánchez-Madrid, et. al., 1979).

Estos eventos muestran la relevancia de la fosforilación de las proteínas ribosomales ácidas, la cual puede demostrarse *in vivo* (incubando a las células con ^{32}P -ortofosfato) o *in vitro* (incubando ribosomas o sus subunidades con $[\text{}^{32}\text{P}]\gamma\text{-ATP}$ y proteína cinasa). No obstante, tanto en células animales como en vegetales, los patrones de fosforilación de proteínas que se observan *in vivo* e *in vitro* son diferentes ya que se ha encontrado que el número de proteínas y la cantidad de fosfato incorporado a las proteínas ribosomales *in vitro* es mayor que el encontrado *in vivo* (Sepúlveda, 1992).

Previos trabajos han mostrado que los ribosomas de maíz contienen 2 proteínas ribosomales ácidas (PRAs) similares a P1 y P2 de mamíferos, los cuales incorporan ^{32}P -ortofosfato activamente durante la germinación de manera regulada (Pérez-Méndez, et. al., 1993). PRAs fosforiladas en el ribosoma traducen *in vitro* a velocidades mayores que en un sistema conteniendo PRAs no fosforiladas por lo que la fosforilación de PRAs puede tener un relevante papel regulatorio en la traducción en este específico estado de desarrollo de ejes de maíz. (Aguilar, et. al., 1998).

La presencia de un proceso de fosforilación para los componentes del tallo ribosomal, implica la existencia de una reacción de desfosforilación, desafortunadamente son pocos los datos de las proteín-fosfatasa que participan en la desfosforilación de proteínas ribosomales, factores de iniciación y elongación, así como, de otros componentes de la maquinaria traduccional que son fosforilables (Kramer, et. al., 1989; Redpath & Proud, 1990).

En *Saccharomyces cerevisiae* se purificó recientemente una proteín-fosfatasa, a partir de la fracción citosólica, capaz de desfosforilar a las proteínas P así como a la proteína P0, las cuales

resultan ser buenos sustratos de esta fosfatasa que es dependiente de la presencia de Mn^{2+} (Pilecki, et. al., 2000).

Aún faltan demostraciones más contundentes para probar la influencia de la fosforilación de las proteínas ribosomales ácidas en la actividad ribosomal, sin embargo, queda claro que las proteínas cinasas (Szyszka, 1999; Rodríguez-Gabriel, et. al., 1999) pueden tomar parte en la regulación de la actividad de las proteínas P junto con las proteínas fosfatasas.

Briones, (1993) extrajo de ribosomas de ejes embrionarios de maíz fosfoproteínas ácidas con aparente masa molecular de 14.5 y 16 kDa, estos péptidos fueron identificados en forma genérica por inmuno reactividad con anticuerpos contra proteínas ribosomales ácidas de levadura. Sin embargo, no se identificó cada una de las proteínas en lo particular. El propósito de este trabajo es precisamente identificar a dichos péptidos como P1 y P2, así como caracterizar su grado de fosforilación durante la germinación. De esta forma se pretende aportar más datos para comprender el mecanismo de control que tienen las proteínas ribosomales ácidas, mediante el proceso de fosforilación, en la síntesis de proteínas.

HIPÓTESIS

Basada en los antecedentes expuestos se construye la siguiente hipótesis de trabajo:

Se espera encontrar un diferente grado de fosforilación entre las proteínas ribosomales ácidas P1 y P2 de los ribosomas de ejes embrionarios de maíz a las 24 horas de germinación y las de ejes embrionarios en estado quiescente, debido a los cambios de actividad en síntesis de proteínas a lo largo de la germinación. Además se esperaría una secuencia de aparición en el ribosoma de las formas fosforiladas de las proteínas ribosomales ácidas como respuesta a la necesidad de las células de regulación del proceso de traducción durante la germinación.

OBJETIVO

Caracterizar individualmente a las proteínas ribosomales ácidas de ejes embrionarios de maíz germinados 24 h, como P1 y P2 con base en sus características fisicoquímicas y conocer el grado de fosforilación que presenta cada una de estas proteínas durante el período de germinación.

Para lograr lo anterior, se plantean las siguientes metas:

1. Aislar y separar electroforéticamente a las proteínas ribosomales ácidas.
2. Determinar el pI de cada una de las proteínas ribosomales ácidas, por medio de isoelectroenfoque
3. Comparar mediante isoelectroenfoque el patrón electroforético de las proteínas ribosomales ácidas de ejes embrionarios germinados con las de ejes embrionarios quiescentes.
4. Comparar la relación de formas fosforilada(s) - desfosforilada presente para cada proteína ribosomal en la fracción polisomal y no polisomal al término de 24 h de germinación de ejes embrionarios de maíz.
5. Caracterizar a los péptidos ácidos como P1 y P2 de acuerdo a su masa molecular, punto isoeléctrico y grado de fosforilación encontrados en cada uno de ellos.

IV. METODOLOGÍAS

1. Material biológico

Las semillas de maíz (var. Chalqueño), se pusieron entre dos capas de algodón humedecido con agua desionizada y se germinaron 24 h a 25 °C en la obscuridad. Al final del tiempo señalado los ejes embrionarios fueron disectados manualmente y conservados a - 70 °C hasta el momento de emplearlos.

2. Obtención de ribosomas

1 g de ejes embrionarios se homogeneizaron en un mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino el cual fue suspendido en 4 volúmenes de buffer de extracción B1 a 4 °C. Se agitó 10 minutos y se centrifugó a 15,000 RPM (rotor Beckman JA-20) a 4 °C por 30 minutos, después el sobrenadante se centrifugó a 53,000 RPM (rotor Beckman 60 Ti) a través de un colchón de sacarosa (0.5 M sacarosa y 0.5 M KCl en buffer B1) por 3.5 h a 4 °C. El sedimento corresponde al pellet ribosomal (Sharf & Nover, 1982).

3. Obtención de polisomas

0.75 g de ejes embrionarios se homogeneizaron con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino que fue suspendido en 6 volúmenes de buffer de extracción B2. Se homogeneizó y se centrifugó a 10,000 RPM (rotor Beckman JA-20) a 4 °C por 2 minutos, se extrajo el sobrenadante y se dejó reposar en hielo 15 minutos, se centrifugó nuevamente a 10,000 RPM por 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante se centrifugó a través de un colchón de sacarosa, en proporción de 1 mL de sobrenadante / 1 mL de colchón (0.67 M sacarosa en buffer B2, ver apéndice) por 3 h a 4 °C a 50,000 RPM (rotor Beckman 60 Ti). El sedimento corresponde al pellet polisomal. El sobrenadante se centrifugó a 53,000 RPM (rotor Beckman 60 Ti) a través de un colchón de sacarosa (0.5 M sacarosa) por 3.5 h a 4 °C (rotor Beckman 60 Ti). El sedimento corresponde al pellet no polisomal.

4. Aislamiento de proteínas ribosomales ácidas (PRAs)

Para conocer la pureza de los ribosomas extraídos, el pellet ribosomal fue suspendido en 1 mL de buffer B3, se tomó una alícuota de 10 µL, se llevó a 1 mL y se leyeron las absorbancias a 260 y 280 nm. A los 990 µL restantes del pellet suspendido se agregaron 2 mL de buffer B4, se agitó por 20 minutos a 4 °C, se añadió lentamente etanol (1:1/2 v/v) y se mezcló agitando por 10 minutos a 4 °C, se repitió la adición de etanol en la misma proporción y condiciones,

posteriormente se centrifugó a 10,000 RPM (rotor Beckman JA-20) a 4°C por 10 minutos. El sedimento se descartó y el sobrenadante se transfirió a 2.5 volúmenes de acetona fría, se dejó reposar a - 20 °C toda la noche para favorecer la precipitación de las proteínas ribosomales ácidas (PRAs).

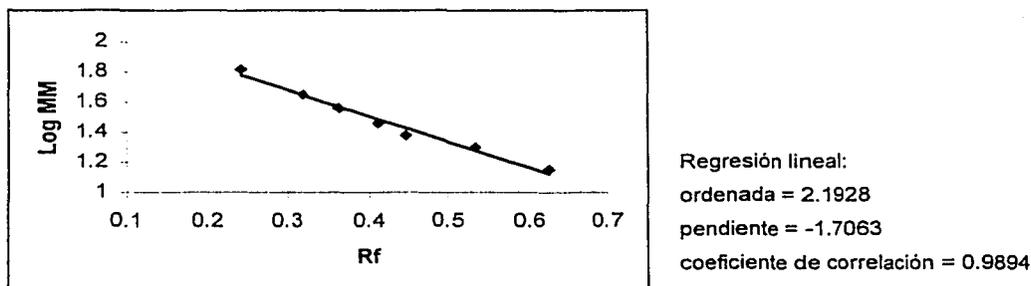
Cuando se hizo evidente el precipitado de proteínas al día siguiente se centrifugó a 10,000 RPM (rotor Beckman JA-20) a 4°C por 20 minutos. La pastilla obtenida se secó evaporando la acetona, quedando las PRAs en forma de polvo el cual se puede pesar o bien disolverse en la mínima cantidad de agua desionizada para cuantificar la proteína por el método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando albúmina sérica de bovino (BSA Sigma®) como estándar.

5. Electroforesis-SDS de proteínas ribosomales ácidas (PRAs)

Una vez calculada la concentración de proteína se preparó la muestra para la electroforesis, para ello se tomaron alícuotas de 20 a 50 µg de proteína y se mezclaron con 2 volúmenes de buffer B5. La electroforesis SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) se realizó con geles al 15 % de acrilamida. Una vez terminada la electroforesis los geles se destinaron para Western blot o para teñirse con azul brillante de Coomassie R-250 al 0.2 %. Para revelar el patrón electroforético de las proteínas los geles se destiñeron con ácido acético 7% - metanol 30%

6. Curva de calibración de masa molecular

Para conocer la masa molecular de los péptidos de interés en un mini gel de acrilamida, se corrió la electroforesis de las proteínas ribosomales ácidas (PRAs) con marcadores de masa molecular de 14.2 a 66 kDa., bajo las condiciones experimentales antes mencionadas, se realizó una regresión lineal entre los Rf (Rate of flow) de los marcadores de masa molecular contra el logaritmo (Log) de la masa molecular respectiva de cada marcador, con los datos de esta relación lineal se obtuvo la gráfica 1, en ella se muestran los valores lineales que se consideraron en la posterior interpolación de los Rf de las PRAs para el cálculo de su masa molecular mediante la ecuación de la línea recta.



Gráfica 1. Marcadores de masa molecular resueltos en gel de poliacrilamida al 15%.

7. Elución de PRAs a partir de bandas de gel de poliacrilamida

Una vez determinada la curva de calibración, en los siguientes geles obtenidos se procedió a calcular el Rf de las proteínas ribosomales ácidas, con respecto a los Rf de los marcadores de masa molecular resueltos en el mismo gel, de esta forma se eligieron las bandas correspondientes a los pesos moleculares 14.5 y 16 kDa para ser cortadas.

Una vez cortadas las bandas de gel de acrilamida se procedió la elución de la siguiente manera:

Cada banda cortada en trozos pequeños se colocó en un tubo corex de 15 mL, se añadió 1 mL de buffer de elusión y se dejó reposar aproximadamente 1 h a 25 °C con agitación ocasional. Pasado el tiempo, se centrifugó 5 minutos a 14,000 RPM (rotor Beckman JA-20) a 4 °C, el sobrenadante resultante se transfirió a otro tubo corex, se le agregaron 4 volúmenes de acetona fría (- 20 °C) y se dejó precipitar las proteínas por 30 minutos a - 70 °C (o toda la noche a - 20 °C cuando el contenido de proteína es bajo). Finalmente se centrifugó a 10,000 RPM (rotor JA-20) durante 10 minutos a 4 °C, el sedimento corresponde al pellet proteico, al cual se le eliminó el sobrenadante y se evaporó el residuo de acetona por 2 ó 3 minutos a temperatura ambiente (Szewczyk & Summer, 1988). Las proteínas secas se guardan a - 70 °C hasta ser utilizadas (no se deben almacenar por más de tres días).

8. Análisis por Western blot (Towbin, et al., 1979)

Transferencia: Las proteínas ribosomales ácidas resueltas por SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de difluoruro de dipolivinilideno (PVDF) mediante un aparato horizontal de transferencia semiseco LKB, Novablot (Amersham Pharmacia Biotech). Para la transferencia se colocó sucesivamente sobre el ánodo lo siguiente:

- A. 3 papeles filtro Whatman 3 mm humedecidos en solución anódica I.
- B. 3 papeles filtro Whatman 3 mm humedecidos en solución anódica II.
- C. La membrana de PVDF equilibrada en solución anódica II.
- D. El gel equilibrado en solución anódica II.
- E. 3 papeles filtro Whatman 3 mm humedecidos en solución anódica III. Finalmente se colocó el cátodo para efectuar la transferencia, la cual transcurrió en 1 hora a 1 mA / cm².

Revelado de la membrana: La membrana de PVDF con las proteínas transferidas se puso en agitación suave en solución de saturación por lo menos 1 hora. Posteriormente, se hicieron dos lavados en TBS 0.15 M de 15 minutos cada uno con agitación leve. Se sacaron las membranas de la solución de saturación y se incubaron con anticuerpos antiPRAs de hígado de ratón a una dilución de trabajo 1:800 en solución de saturación, durante 2 horas a 37 °C, o bien, toda la noche en refrigeración usando agitación leve. Terminado el tiempo de incubación se realizaron

3 lavados, cada uno de 15 minutos, alternando TBS 0.15 M, TBS 1M y finalmente TBS 0.15 M. En seguida las membranas de PVDF se incubaron 2 horas a temperatura ambiente con los segundos anticuerpos antigama globulina (IgG) de ratón (1:2000) conjugados con la enzima peroxidasa. Después, se hicieron dos lavados de 15 minutos con TBS 0.15 M y se reveló por fluorescencia mediante reactivos de detección Amercham Life Science y películas KODAK para diagnóstico X-Omat K XK-1 (Sensible al azul).

9. Isoelectroenfoque (IEF)

Se ensambló el equipo para electroforesis (Hoefer Instrument), se preparó el gel IEF con la siguiente composición:

Acrilamida 30%	2.50 mL
Bisacrilamida 1%	3.00 mL
Urea	7.20 g
Anfolinas (pH 2.5-5.0)	0.96 mL
TEMED	45.0 µL
APS* 10%	70.0 µL
Agua	aforo a 15 mL

* Persulfato de amonio al 10% en agua

** Buffer de muestra: urea 9.5 M (400 µL) + 24 µL de anfolinas (pH 2.5-5.0)

Se llenó la placa con el gel IEF y se colocó el peine, después de gelificarse se enjuagaron los pozos y se eliminó el agua con papel absorbente. Esta parte del equipo (soporte del gel y electrodos) se introdujo en el recipiente complementario que debe contener el buffer ácido (H_2SO_4 1 M).

Teniendo la parte inferior del gel en contacto con el buffer ácido, se colocaron en cada pozo 80-100 µL de muestra en buffer de muestra** (1:1) y encima de esta 10 µL de urea 2 M, finalmente se llenaron los pozos con NaOH 5 M. NOTA: todos los pozos sin muestra deben llevar buffer de muestra, urea 2 M y NaOH 5 M en ese orden.

Finalmente, se llenó la parte superior del equipo, para que el gel haga contacto ahora con el buffer alcalino (NaOH 5 M). Se contacto con la fuente de poder y se recorrió a los siguientes tiempos y voltajes: 50 V 10 min, 100 V 25 min, 200 V 25 min, 300 V 25 min, 400 V 25 min, 500 V 25 min, 600 V 25 min. Después se dejó correr el gel durante 18 h a 250 V, pasado el tiempo, se elevó el voltaje a 600 V por 30 min más y se finalizó la corrida. El gel se desmontó y se tiñó con nitrato de plata.

Tinción con nitrato de plata

- A. Se fijó el gel con ácido tricloroacético (TCA) al 10% durante 1h
- B. Se enjuagó el gel en agua desionizada 5' y se desechó el agua de enjuague.
- C. Se añadieron 100 mL de agua desionizada al gel y se calentó 1 min. en horno de microondas, se sacó para eliminar burbujas formadas durante el calentamiento y se calentó 30 segundos más. Se sacó y agitó el gel suavemente a temperatura ambiente 5 min. Se desechó el líquido.
- D. Se añadió 100 mL de DTT 0.2 mM al gel y se repitió el proceso de calentamiento (punto C).
- E. Se añadió 200 mL de agua desionizada al gel, se enjuagó 5 seg y se desechó el líquido.
- F. Se añadió 100 mL de nitrato de plata al 0.1 % al gel y se repitió el proceso de calentamiento (punto C).
- G. Se añadió 300 mL de agua desionizada y se enjuagó 5 seg, se desechó el líquido.
- H. Se añadió 30 mL de solución reveladora (formaldehído 0.185 % en Na_2CO_3 al 3 %), al formarse un precipitado, se desechó el líquido y se añadió más solución (30 mL / 30" cada vez) hasta la aparición de bandas deseadas.
- I. Se detuvo la reacción de tinción con 25 mL de ácido cítrico monohidratado al 20 %.

10. Tratamiento de ribosomas con fosfatasa alcalina

Los ribosomas aislados y purificados (45 μg) de ejes embrionarios de maíz de 24 h de germinación se suspendieron en Buffer B6 y se añadió 1.5 unidades de fosfatasa alcalina (Sigma). La reacción se realizó a 37° C por 60 min. Los ribosomas tratados son analizados por IEF.

11. Identificación de residuos de aminoácidos fosforilados (inmunodetección)

Proteínas ribosomales ácidas purificadas de ejes embrionarios de maíz se resolvieron en 2 geles de acrilamida al 15 % para ser transferidas a membranas de PVDF, las dos membranas resultantes fueron tratadas para Western blot, empleando anticuerpos contra fosfoserina para una y fosfotreonina para la otra (aminoácidos probables a ser fosforilados en maíz, Briones, 1993). El revelado de las membranas se realizó tal y como se menciona en el punto 9 de la metodología.

V. RESULTADOS

Extracción y purificación de ribosomas de ejes embrionarios de maíz

Uno de los aspectos necesarios para la posterior obtención de proteínas ribosomales ácidas (PRAs) fue el obtener ribosomas puros y con buen rendimiento. La manera de conocer si los ribosomas son puros es calculando la relación de absorbancias a 260/280 nm de los ribosomas. Este cociente considera tanto la absorbancia a 260 nm de las bases nucleotídicas que componen al ácido ribonucleico (ARN) ribosomal, que conforman las dos terceras partes del ribosoma, como la absorbancia a 280 nm de los aminoácidos aromáticos de las proteínas ribosomales que corresponden a la tercera parte restante que forma al ribosoma (Delaunay, 1972).

Se obtuvieron ribosomas con la pureza requerida al pasarlos por un colchón de sacarosa 0.5 M y KCl 0.5 M, durante su extracción, lo cual permitió obtener la partícula ribosomal solamente con las proteínas constitutivas del mismo.

En la tabla 2 se muestran algunos de los valores de la relación A_{260}/A_{280} obtenidos durante las extracciones que se realizaron a lo largo de los distintos experimentos. El valor promedio de la relación obtenida de las diferentes extracciones fue de 1.86 ± 0.05 , la cual resultó ser un valor que se encuentra dentro del intervalo de 1.78 – 1.88 reportado por Delaunay (1972) para ribosomas puros de plantas. Lo anterior indica que se trabajó con muestras de ribosomas de pureza aceptable, considerando que los valores varían dependiendo del tejido y el organismo de donde los ribosomas fueron extraídos y del método de obtención de ribosomas empleado.

TABLA 2 Criterio de pureza de los ribosomas provenientes de ejes embrionarios de maíz.

Valores promedio de las lecturas de absorbancia a 260 y 280 nm de los ribosomas extraídos por triplicado en cada experimento. La relación de las absorbancias, mostradas en la última columna, se encontraron dentro del intervalo de aceptación de pureza para ribosomas vegetales (1.78 – 1.88), con estos datos se comprobó la pureza de los ribosomas obtenidos en cada ensayo.

No. Experimento	A_{260}	A_{280}	A_{260}/A_{280}
1	0.3639	0.1907	1.91
2	0.3276	0.1725	1.90
3	0.2960	0.1646	1.80
4	0.3161	0.5790	1.83
5	0.3032	0.5716	1.88

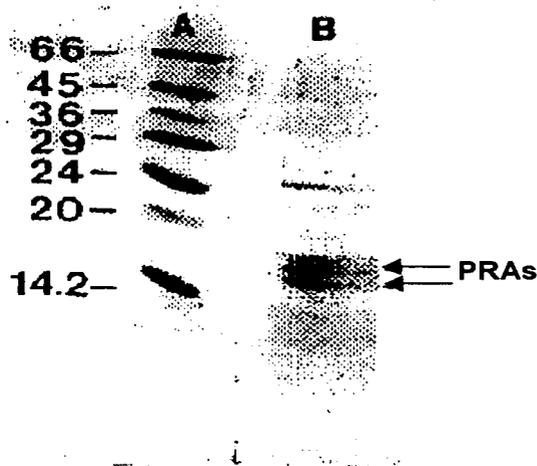
Patrón electroforético de proteínas ribosomales ácidas (PRAs) de ejes embrionarios de maíz

A partir de 10 g de ejes embrionarios de maíz de 24 h de germinación, se extrajeron 54.2 mg de ribosomas puros, de los cuales se extrajeron las PRAs con NH_4Cl 1.5 M / etanol 50% obteniéndose 585 μg de estas proteínas. Las PRAs fueron analizadas por medio de geles de acrilamida al 15% en presencia de SDS y teñidos con azul de Coomassie con el fin de conocer el patrón electroforético de las proteínas extraídas.

En la figura 1 se muestra la resolución de las proteínas ribosomales extraídas a las 24 h de germinación, se observaron bandas intensas de baja masa molecular en la zona correspondiente a las PRAs (14.5 y 16 kDa) también, se alcanzaron a ver bandas de mayor masa molecular entre 66 y 24 kDa; sin embargo, su intensidad es mucho menor a las bandas de interés (señaladas con flechas), lo que sugiere la presencia de proteínas ribosomales básicas como contaminantes que no lograron eliminarse con la extracción selectiva (Nierhaus, 1990). En el caso de la banda cercana a los 24 kDa, cuya intensidad es similar a la de las PRAs, fue reconocida en ensayos previos por los anticuerpos específicos para PRAs, como agregado. La explicación para las bandas observadas por debajo de 14.2 kDa es la presencia de algunas proteínas contaminantes que no se logran separar de los ribosomas después de pasarlo por el colchón de sacarosa, o bien, de una degradación de los péptidos ácidos.

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

a



b

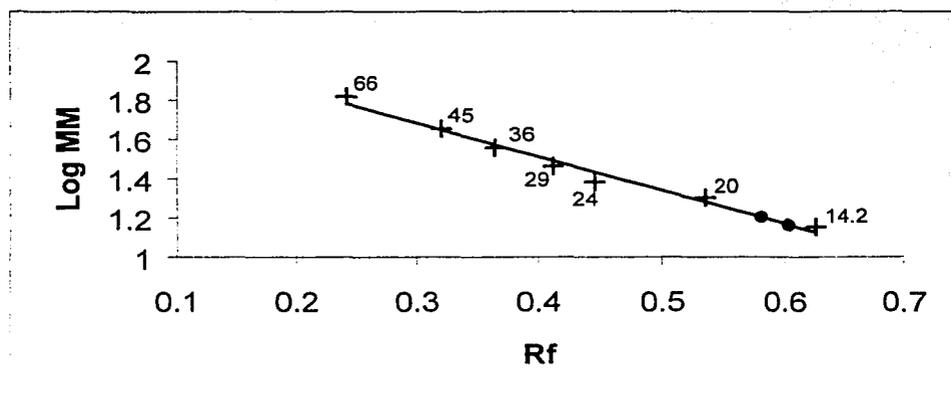


Fig. 1. Cálculo de la masa molecular de las proteínas ribosomales ácidas (PRAs), resueltas en electroforesis SDS-PAGE, mediante la relación lineal de los desplazamientos y logaritmos de las masas moleculares de los marcadores proteicos.

- Las PRAs extraídas con NH_4Cl /etanol, fueron analizadas en un gel al 15% de acrilamida y teñido con azul de Coomassie. A) marcadores de masa molecular, B) Proteínas ribosomales ácidas de ejes embrionarios de maíz germinados 24 h.
- Interpolación de los Rf (0.5801 y 0.603) de las bandas correspondientes a las proteínas ribosomales ácidas (•) en la curva de calibración de masas moleculares (+). Los valores de Rf de las PRAs correspondieron a las masas de 14.5 y 16 kDa.

Purificación y separación de las proteínas ribosomales ácidas (PRAs) de ejes embrionarios de maíz

Después de resolver las PRAs en electroforesis desnaturalizante y de identificar las bandas correspondientes a 14.5 y 16 kDa, se procedió a cortar manualmente con escalpelo cada una de las bandas antes mencionadas, las cuales posteriormente fueron colocadas en buffer de elución para obtener las PRAs en solución. Finalmente las proteínas se resolvieron nuevamente en un gel de acrilamida al 15% para corroborar la total separación de los péptidos de 14.5 y 16 kDa. En la figura 2A, se muestra al carril 1) como el marcador de masa molecular, en 2) el péptido de 14.5 kDa y en 3) el péptido de 16 kDa, ambos péptidos aparecen como únicas bandas en su respectivo carril, de manera que la técnica de elución empleada es eficiente para la extracción y purificación de ambos péptidos, siempre y cuando sea buena la resolución de las bandas a cortar.

Por otra parte, utilizando la técnica de Western blot con la réplica del gel mostrado en la figura 2A, se confirmó por medio de anticuerpos que los péptidos separados efectivamente corresponden a las PRAs. El revelado se llevó a cabo por inmunofluorescencia (ECL Amersham), se muestra en la figura 2B, en donde se hace evidente el reconocimiento de los péptidos por el anticuerpo específico, lo cual confirma que las bandas 14.5 y 16kDa son los péptidos de carácter ácido de nuestro interés y que siguiendo estas técnicas se obtuvieron ambas proteínas puras.

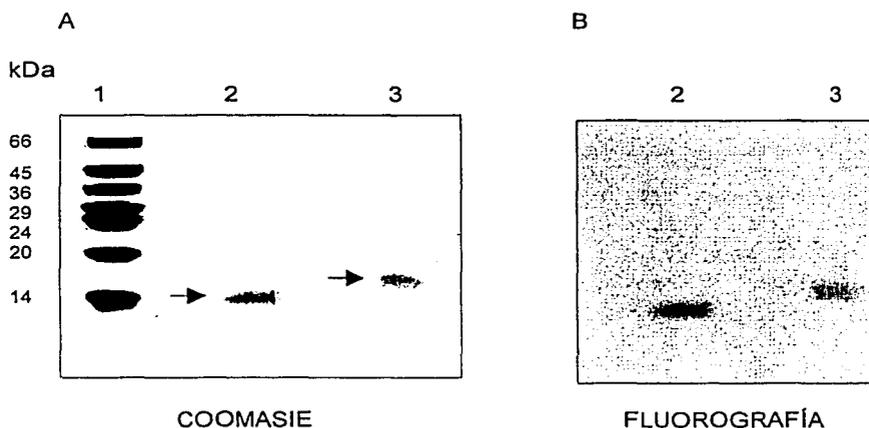


Fig. 2. Proteínas ribosomales ácidas purificadas de ejes embrionarios de maíz de 24 h de germinación.

Las proteínas ribosomales ácidas, separadas mediante elución de las bandas de gel (Fig. 1), fueron analizadas por electroforesis SDS-PAGE al 15% teñido con azul de Coomassie (panel A) y Western Blot (panel B), utilizando anticuerpos contra PRAs de hígado de ratón (dilución 1:700) y como segundo anticuerpo IgG de conejo (dilución 1:2000) conjugado con peroxidasa. Carriles : 1) marcadores de masa molecular, 2) péptido ribosomal ácido de 14.5 kDa y 3) péptido ribosomal ácido de 16 kDa

Caracterización fisicoquímica de las proteínas ribosomales ácidas (PRAs) de ejes embrionarios de maíz

Después de separar las PRAs, cuyas bandas corresponden a 14.5 y 16 kDa, se procedió a tratar cada péptido para resolverlo en un gel de urea en un intervalo de pH de 2.5 - 5.0, con el fin de corroborar su carácter ácido mediante su punto isoelectrico (pI). Este proceso, se realizó tomando como referencia ribosomas puros y completos de ejes embrionarios de maíz de 0 y 24 h de germinación.

En el primer carril de la figura 3, se muestra el control de 0 h de germinación, en estos ribosomas, se corroboró que los péptidos ácidos se encuentran desfosforilados (Aguilar et. al., 1998). En el segundo carril aparecen cinco bandas para las proteínas ácidas de ejes embrionarios de 24 h de germinación, se observa que migran en un intervalo de pH 4.0 a 4.5. En este caso, las bandas corresponden a los dos péptidos ácidos, además de sus respectivas formas fosforiladas, así que en los carriles tercero y cuarto puede identificarse claramente cuáles bandas pertenecen a las formas de cada péptido (14.5 y 16 kDa). Haciendo correspondencia entre las bandas de los péptidos aislados y el control, se considera que la primera banda para cada péptido (14.5 ó 16 kDa) corresponde a la forma desfosforilada y hacia abajo las bandas pertenecen a las formas fosforiladas respectivas; nótese que para el péptido de 14.5 kDa hay más de una forma fosforilada.

En la figura. 3 se designa a los péptidos ácidos como P1 y P2, de acuerdo con los datos teóricos para las formas P1 y P2 de maíz, se compararon estos datos con los aquí obtenidos experimentalmente, también se compararon con los puntos isoelectricos (pI) y masas moleculares (MM) de diferentes organismos eucariotes (figura 4). Los pI para cada péptido fosfo y desfosforilado, se determinaron experimentalmente mediante la medición del pH de las proteínas eludías con agua desionizada de las bandas obtenidas en el isoelectroenfoque para cada péptido. Se comprobó que P2 corresponde al péptido que tiene menor MM (14.5 kDa) y mayor pI (4.5), caso contrario para P1 que tiene mayor MM y menor pI (4.2). Esta información nos permite proponer que el péptido cuya masa molecular es de 14.5 kDa corresponde a la P2 y la de 16 kDa a la P1.

Ahora bien, de las cinco bandas observadas en el IEF las tres más ácidas podrían corresponder a diferentes formas fosforiladas de P1 y P2 ya que es sabido que las formas fosforiladas serán siempre más ácidas que las desfosforiladas (Kouyanou, et. al., 1998). Para comprobar esto, se sometió a los ribosomas de 24 h de germinación a un tratamiento con fosfatasa alcalina, tal y como se describe en el apartado siguiente.

CARRILES

1

2

3

4

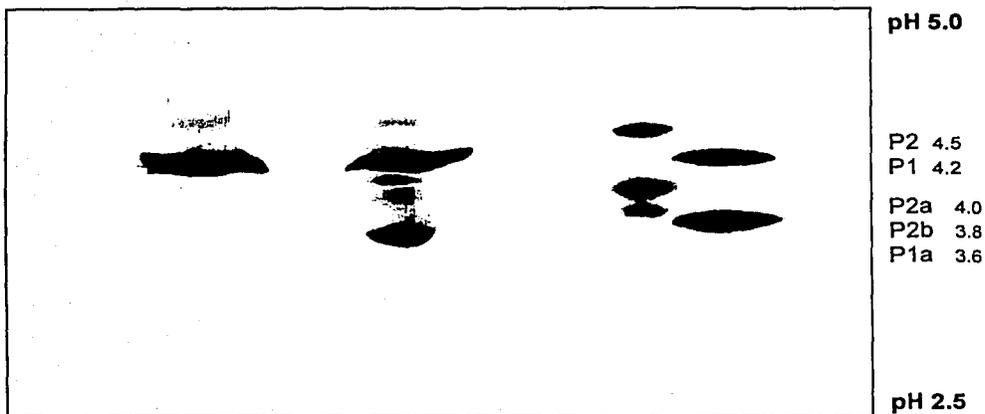


Fig 3. Separación por isoelectroenfoque de las proteínas ribosomales ácidas purificadas e identificación de las formas fosforiladas.

Se analizaron 20-30 μg de cada uno de los péptidos ácidos 14.5 y 16 kDa (carriles 3 y 4 respectivamente), purificados por elución de las bandas de gel (Fig. 1), se tomaron como controles ribosomas de ejes embrionarios de maíz a 0 h (carril 1) y 24 h (carril 2) de germinación. El gradiente de pH empleado en el gel de acrilamida y urea fue de 2.5 a 5. La tinción se llevó a cabo con nitrato de plata.

Organismo	Proteína	MM teóricos	pI	MM reales	pI	Referencia
<i>Zea mays</i> *	P1	11.4	4.1	16	4.2	a
<i>D. melanogaster</i>	P1	11.50	4.33	17	ND	b
<i>Ceratitidis capitata</i>	P1	11.61	5.08	17	ND	c
<i>Rattus norvegicus</i>	P1	11.31	4.28	11.49	ND	d
<i>Zea mays</i> *	P2	12.2	4.3	14.5	4.5	a
<i>D. melanogaster</i>	P2	11.75	4.65	15	ND	b
<i>Ceratitidis capitata</i>	P2	11.85	5.51	15	ND	c
<i>Rattus norvegicus</i>	P2	11.53	4.44	11.69	ND	d

^a Bailey-Seres, et. al., 1997; ^b Wigboldus, 1987; Qian, et. al., 1987; ^c Gagou, et. al., 1999; ^d Wool, et. al., 1991.

ND: No determinado

Fig. 4. Comparación de masa molecular (kDa), punto isoeléctrico (teóricos y reales) de las proteínas ribosomales ácidas P1 y P2 de maíz con las de otros organismos eucariotes. Nótese que entre los organismos eucariotes, sólo en maíz se ha determinado experimentalmente el punto isoeléctrico; sin embargo, los datos teóricos concuerdan que el péptido P1 es más ácido que el péptido P2.

Determinación de las formas fosforiladas de las proteínas ribosomales ácidas P1 y P2 de ejes embrionarios de maíz

Los ribosomas purificados de 24 h de germinación se pusieron a incubar con fosfatasa alcalina durante 24 h a 37°C. En la figura 5, se observa el gel de las PRAs control y desfosforiladas teñido con plata. Aparecen 5 bandas en ambos carriles, sin embargo, para los ribosomas tratados con fosfatasa se hace evidente una disminución en la concentración de las últimas tres bandas (más ácidas).

Esto apoya la propuesta de que éstas bandas corresponden a las formas fosforiladas de las PRAs, ya que las dos bandas superiores no sufren modificación alguna. Para analizar más de cerca la dinámica de desfosforilación de las proteínas ácidas por acción de la fosfatasa alcalina, se recurrió a una cinética de desfosforilación que abarcara períodos de incubación entre 0 y 24h.

La figura 6 muestra la acción enzimática a las 3, 6 y 9 h de incubación de la fosfatasa con el ribosoma, se observa que la enzima no desfosforila apreciablemente a las 3 h de tratamiento, a las 6 h se observa una mayor actividad que permanece casi igual hasta las 9 h, sin embargo para las 24 h de se nota una disminución en la intensidad de las bandas que corresponde a los péptidos más ácidos, especialmente para P1, para el que ya no se visualiza la forma fosforilada. Esto sugiere que las tres bandas más ácidas, efectivamente corresponden a las formas fosforiladas.

Dado que se conoce que la proteína cinasa que fosforila a las proteínas ribosomales ácidas se encuentra en el ribosoma (Sepúlveda, 1992), se diseñó el experimento en sentido inverso, así que se recurrió a una cinética de fosforilación *in vivo*, en la cual se germinaron semillas de maíz, en lotes con diferentes tiempos de incubación.

En la cinética de fosforilación *in vivo* (figura 7), se encontró que las formas del péptido P2 son las primeras en aparecer (40 y 255 min.), mientras que la correspondiente a P1 demora 255 min. para iniciar su fosforilación. El ensayo fue diseñado para saber si efectivamente se trataban de formas fosforiladas y conocer su orden de aparición *in vivo* en las primeras horas de la germinación de semillas de maíz, lo cual fue logrado.

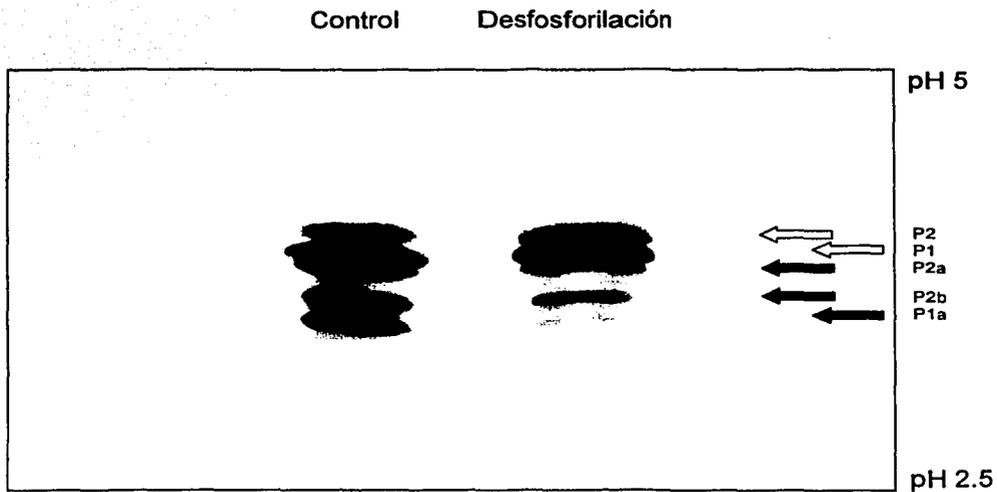


Fig 5. Isoelectroenfoque de ribosomas de ejes embrionarios de maíz germinados durante 24 h.

El control representa a las proteínas ribosomales ácidas (flechas blancas) con sus respectivas formas fosforiladas (flechas negras) (ribosomas que no tuvieron tratamiento con fosfatasa alcalina), en desfosforilación se muestra el grado de desfosforilación que presentan las formas, después de someter a los ribosomas a incubación con fosfatasa alcalina a 37 °C / 24 h.

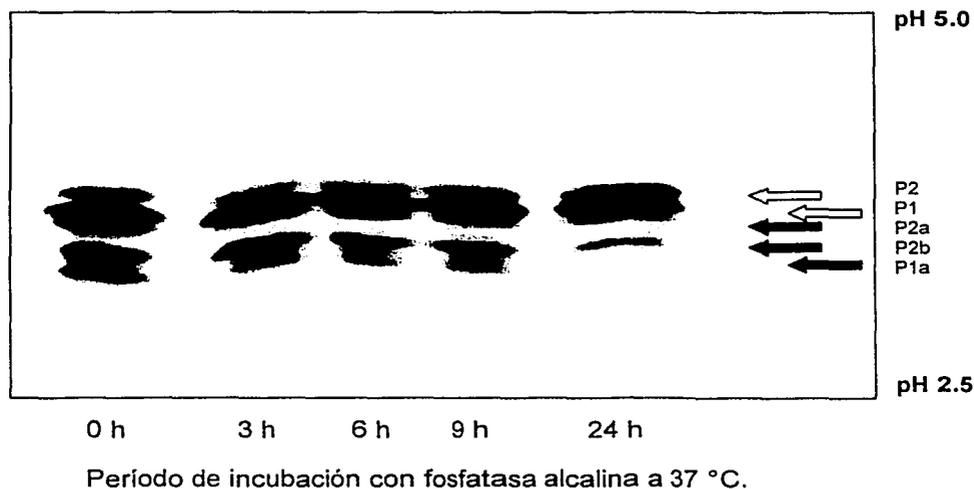


Fig. 6. Cinética de desfosforilación de proteínas ribosomales ácidas.

IEF de ribosomas de ejes embrionarios de maíz germinados durante 24h. Patrón electroforético de las PRAs: las flechas blancas indican las formas desfosforiladas por acción de la enzima fosfatasa alcalina a las horas de incubación indicadas en cada carril. Las flechas negras indican las posibles formas fosforiladas.

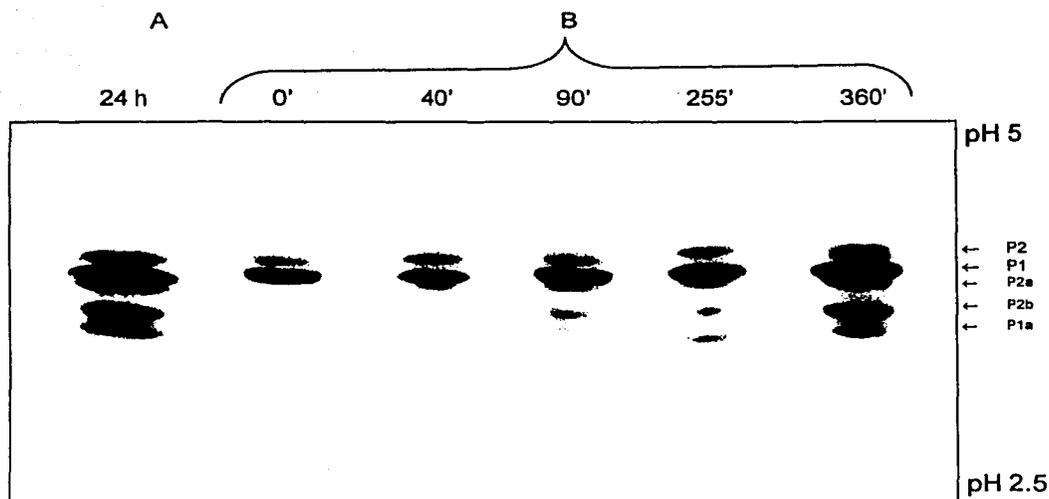


Fig. 7. Cinética de fosforilación de proteínas ribosomales ácidas *in vivo*.

Isoelectroenfoque de ribosomas de ejes embrionarios de maíz. Gel de acrilamida y urea teñido con nitrato de plata.

A. Ribosomas de 24h de germinación. Patrón electroforético de las PRAs.

B. Ribosomas obtenidos de ejes embrionarios de maíz germinados a diferentes intervalos de tiempo.

Patrón electroforético de proteínas ribosomales ácidas (PRAs) de ejes embrionarios de maíz provenientes de las fracciones polisomal y no polisomal

La fracción polisomal y no polisomal, obtenidas como se indica en la metodología, fueron resuspendidas en buffer Hepes, de cada suspensión se tomó una alícuota cuya densidad óptica fue de 2.0 (límite de sensibilidad de la técnica de tinción de plata), de la fracción no polisomal no hubo suficiente cantidad para obtener las densidades ópticas requeridas para analizarse por isoelectroenfoque, así que se tomó como equivalente a esta fracción los ribosomas provenientes de ejes embrionarios de maíz con 0 h de germinación, ya que se ha demostrado (Beltrán, et. al., 1995) que en ejes secos se encuentran ausentes los polisomas. En la figura 8 se puede comparar el patrón electroforético de la fracción polisomal (carril 1) y fracción no polisomal (carril 2) con el de las proteínas ribosomales ácidas de ribosomas completos de ejes embrionarios de maíz de 24 h (carril 3).

En la fracción polisomal las bandas pertenecientes a la forma desfosforilada y la segunda forma fosforilada de P2 disminuyen de intensidad con respecto al patrón electroforético mostrado en el carril 3, mientras la primera forma fosforilada muestra un incremento en su concentración. En cuanto a P1, se muestra en mayor proporción desfosforilada en el control (carril 3), mientras que en la fracción polisomal es más abundante en su forma fosforilada.

Este resultado deja ver que en ambos péptidos P1 y P2 la relación fosforilada / desfosforilada de sus formas, cambia durante la germinación. Además los resultados indican que los polisomas contienen PRAs fosforiladas en mucha mayor proporción que los ribosomas que no están formando parte de los polisomas, es decir, los que no están participando activamente en la síntesis de proteínas y en los que las formas fosforilables resultaron indetectables en nuestro gel (figura 8).

Por otra parte, la presencia de PRAs desfosforiladas tanto a 0 como a 24 h comprueba que la fosforilación de las PRAs no es necesaria para su ensamblaje al ribosoma de ejes embrionarios de maíz.

También puede decirse que la proteína P1 permanece casi constante durante la germinación, esto sugiere que P1 esta siendo requerida en la célula en mayor cantidad y en estado fosforilado durante este período, mientras que P2 va apareciendo e incrementándose en sus formas fosforiladas como puede apreciarse en la cinética de fosforilación, donde en los primeros minutos de la germinación es la proteína que predomina en ambas formas, este hecho pudiera atribuirse a que P2 fosforilada es necesaria para iniciar la interacción con el factor eEF-2 aún con P1 desfosforilada, aunque la fosforilación de ambas proteínas es necesaria para estabilizar la interacción con el factor de elongación durante la síntesis de proteínas (Vard, et. al., 1997).

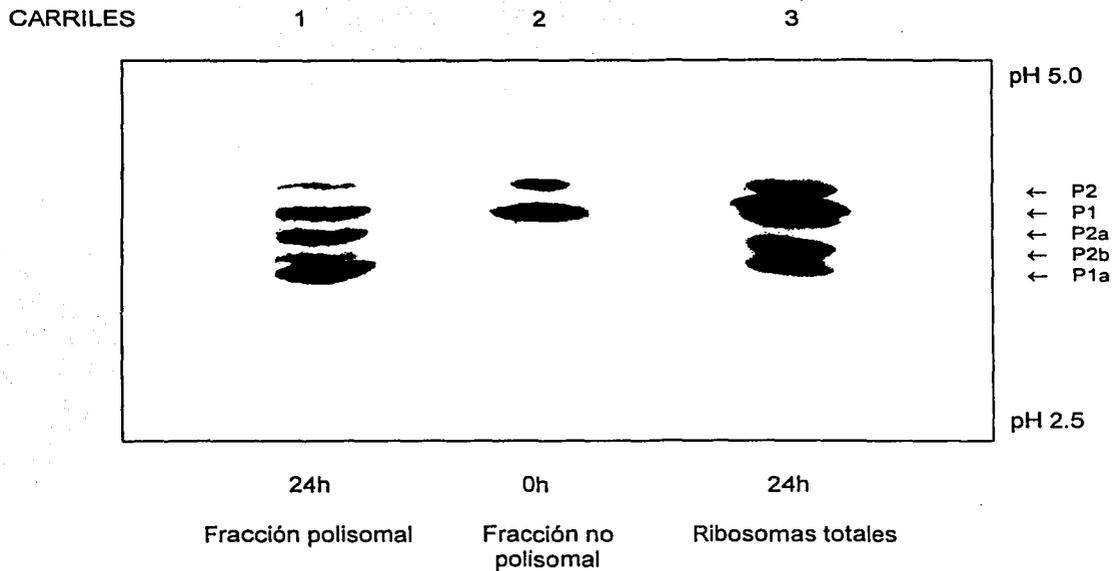


Fig 8. Análisis por IEF de las proteínas ribosomales ácidas en los ribosomas de 0 y 24 h y en la fracción polisomal a las 24 h de germinación.

Se analizaron 2 D.O. de cada uno de los ribosomas resuspendidos en HEPES, se tomaron ribosomas de ejes embrionarios de maíz a 24 h de germinación con un colchón de sacarosa 0.64 M (fracción polisomal) (carril 1), y ribosomas de ejes embrionarios de maíz a 0 h (carril 2) (fracción no polisomal) y 24 h (carril 3) (ribosomas totales) de germinación. El gradiente de pH empleado en el gel de acrilamida y urea fue de 2.5 a 5. La tinción se llevó a cabo con nitrato de plata.

Identificación de residuos de aminoácidos fosforilados (inmunodetección)

Ya que la evidencia anterior indica un grado diferencial de fosforilación de P1 y P2, queda por determinar si la fosforilación ocurre a nivel de serina (S), treonina (T), o tirosina (Y). Para ello se reprodujo una cromatografía en capa fina tal y como lo reportan en anteriores experimentos (Briones, 1993), el resultado obtenido no fue satisfactorio, pues al revelar las manchas que nos indicarían el aminoácido fosforilable, quedaron como un barrido continuo donde no hay claridad para saber con certeza los residuos de aminoácidos fosforilados, sin embargo, este ensayo sirvió como antecedente para descartar al aminoácido tirosina como residuo fosforilable, ya que la posición en la que migra el estándar fosfotirosina, no se presenta en nuestra muestra analizada. Debido a lo anterior, se recurrió a una técnica más precisa para determinar los residuos de aminoácidos fosforilados, que consistió en emplear anticuerpos monoclonales específicos para fosfoserina y fosfotreonina. El resultado del Western blot se muestra en la figura 9, donde se pudo apreciar claramente que el residuo de aminoácido fosforilable en las PRAs de 14.5 y 16 kDa es de serina únicamente (carril C), también se observó la identificación de una banda cercana a los 24 kDa, que en los resultados anteriores se identificó como agregado de las PRAs, por lo que suponemos que fue reconocida por este antifosfoserina como antes lo fue por el antiPRAs. En el carril D se observa que está ausente algún residuo de treonina fosforilado en las PRAs. Con este resultado y con ayuda de las secuencias de aminoácidos (figura 10) para cada péptido, podrían sugerirse las posiciones de las serinas fosforilables, las cuales serían objeto de estudio de una futura investigación.

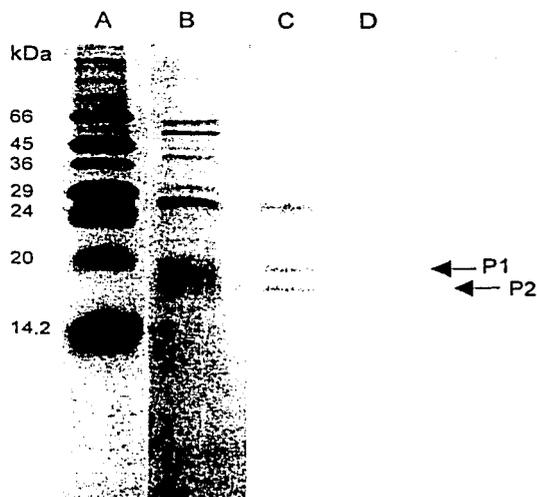


Fig.9 Identificación del residuo fosforilable en las proteínas ribosomales ácidas (PRAs) P1 y P2.

Electroforesis SDS-PAGE. Marcador de masa molecular (carril A) y PRAs extraídas de ribosomas con $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{EtOH}$ (carril B). Western blot. Revelado con anticuerpo contra fosfoserina (dilución 1:50) que cruza con las bandas correspondientes a los péptidos P1 y P2 (carril C) y revelado con anticuerpo contra fosfotreonina (dilución 1:50) que no cruza con las bandas correspondientes a los péptidos P1 y P2 (carril D).

Organismo	Proteína	Fragmento secuencia de aa	No. acceso
<i>Zea mays</i> *	P1	96 -KEESDDDDMGFSLFD	U62752
<i>Clamydomonas reinhardtii</i>	P1	91 -EPSEEDDMGFSLFD	X66411
<i>S. cerevisiae</i>	P1 α	90 -KEESDDDDMGFGLFD	M26504
<i>S. cerevisiae</i>	P1 β	90 -AEESDDDDMGFGLFD	M26507
<i>D. melanogaster</i>	P1	96 -SDQSDDDDMGFGLFD	Y00504
<i>Rattus norvegicus</i>	P1	98 -SESEDDDMGFGLFD	R5RT12
<i>Homo sapiens</i>	P1	98 -SEESDDDDMGFGLFD	M17886
<i>Zea mays</i> *	P2	96 -KEESDDDDMGFSLFD	U29383
<i>Oryza sativa</i>	P2	118 -EKEESDDDDMGSLFD	D16065
<i>Arabidopsis thaliana</i>	P2	99 -KEESDDDDMGFSLFE	P51407
<i>Parthenium argentatum</i>	P2	96 -EEESDEELGFSLFDDN	P41099
<i>S. cerevisiae</i>	P2 α	90 -AEESDDDDMGFGLFD	M26503
<i>S. cerevisiae</i>	P2 β	94 -KEESDDDDMGFGLFD	M26505
<i>D. melanogaster</i>	P2	97 -SESEDDDDMGFGLFE	X05016
<i>Rattus norvegicus</i>	P2	99 -SEESDDDDMGFGLFD	R6RTP2
<i>Homo sapiens</i>	P2	99 -SEESDDDDMGFGLFD	M17887

Fig. 10 Secuencias de aminoácidos (fragmento del extremo carboxilo, tomadas directamente del GenBank; * Goddemeir, et. al., 1996) de las proteínas ribosomales ácidas de diferentes organismos.

En negritas se ubica el aminoácido serina (s) el cual se reporta fosforilado en eucariotes, la(s) posición(es) en la secuencia varía(n) del organismo.

La similitud de las secuencias de aminoácidos de estos organismos se presenta en el extremo carboxilo terminal (últimos 14 aminoácidos) un fragmento altamente conservado durante la evolución de las especies.

La flecha señala la serina presente en los organismos vegetales que está sustituida por glicina en organismos animales.

VI. DISCUSIÓN

A través del método NH_4Cl /Etanol se lograron aislar selectiva y favorablemente a las proteínas ribosomales ácidas (PRAs) de ejes embrionarios de maíz (figura 1), sin embargo también se extraen aunque en menor cantidad, algunas proteínas no ácidas de masa molecular mayor a 24 kDa, éstas proteínas contaminantes no afectan el procedimiento de separación de las proteínas ribosomales ácidas, pero quizá podría eliminarse con concentraciones de NH_4Cl de 1.5 a 2 M, para hacer más selectiva la extracción.

También se notó una banda de masa molecular elevada (entre 24 y 29 kDa), la cual fue reconocida por el anticuerpo contra PRAs de hígado de ratón, lo que sugiere que se trató de un agregado de las proteínas ribosomales ácidas. Se ha reportado que las PRAs son bastante hidrofóbicas, dada su riqueza de aminoácidos de este tipo (20% alanina; Matheson et al., 1986) por lo que, podrían ser las interacciones hidrofóbicas las probables causantes de la formación de agregados. Este fenómeno se observó más claramente después de guardar a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ las PRAs, hecho que se hacía con objeto de contar con mayor cantidad de proteínas como requisito para poder visualizarlas adecuadamente en cada uno de los procedimientos de caracterización. En términos prácticos, esto resulta un inconveniente, ya que limita la manipulación de las proteínas para su separación y caracterización, también puede provocar falta de reproducibilidad en los análisis.

La solución a este obstáculo fue el empleo de agentes desnaturalizantes (urea 8M, SDS al 0.1%) y la elución de proteínas por difusión pasiva, con estas técnicas se limitó el tiempo y se mejoraron las condiciones para obtener las PRAs y evitar la formación de agregados.

Una vez aisladas y separadas las PRAs provenientes de ejes embrionarios de maíz de 24h de germinación, se comprobó por electroforesis e inmunodetección que los péptidos ácidos poseen masas moleculares de 14.5 y 16 kDa, confirmando trabajos previos (Briones, 1993; Pérez-Mendez, et. al., 1993) en este modelo de estudio (*Zea mays* L.), en que se habían encontrado a las PRAs con aparente masa molecular de 14.5 y 16 kDa en extractos de ejes embrionarios, pero no habían sido identificados individualmente. En el presente trabajo se determinó que el péptido de 16 kDa (pI 4.2) es más ácido que el de 14.5 kDa (pI 4.5) por su migración en el isoelectroenfoque en el intervalo de pH 2.5 – 5.0 (figura 3). Estos resultados concuerdan con la secuencia de aminoácidos de las PRAs de maíz publicada (Goddemeier, et. al., 1996), donde se puede identificar como P2 y P1 a las PRAs de 14.5 y 16 kDa respectivamente, estos datos coinciden con los de sus análogos eucariotes, *Drosophylla melanogaster* y *Ceratitis capitata* (Gagou, et. al., 1999), donde P1 es más pesada y en la rata (Vard, et. al., 1997; Bou, et. al., 2000), donde P1 es más ácida que P2.

En cuanto al estudio del grado de fosforilación de los péptidos ácidos en maíz, se logró comprobar la autenticidad de tres formas fosforiladas, mediante las cinéticas de fosforilación y

desfosforilación, dos correspondientes a P2 y una a P1 (figura 3). Se recurrieron a estas pruebas de identificación de formas fosforiladas, debido a que se tienen antecedentes de este fenómeno en nuestro modelo de estudio (Sepúlveda, 1995), en el que se demostró que la fosforilación ocurre sin ninguna cinasa agregada debido a que la proteína cinasa específica para PRAs ha sido encontrada en la subunidad 60S de los mismos ribosomas. La misma subunidad en donde se ensamblan las PRAs. Esta cinasa de proteína ribosomal ácida ha mostrado fosforilar eficientemente *in vitro* a las PRAs ya ensambladas en el ribosoma (Sepúlveda, 1995). En general las proteínas P son fosforiladas *in vitro* por caseína cinasa tipo II (Hasler, et. al., 1991) u otra cinasa similar (Pilecki, et. al., 1992; Szyszka, et. al., 1996) en el último residuo de serina cercano a la secuencia del péptido conservado hacia el C-terminal (Kudlicki, et. al., 1980; Hasler, et. al., 1991; Zambrano, et. al., 1997). Así que la específica podría fosforilar en otro sitio dando probables péptidos multifosforilados.

La elucidación del correspondiente grado de fosforilación para P1 y P2 y la observación de que existe mayor proporción de P2 con respecto a P1 tanto en su forma desfosforilada como fosforilada, al término del período de germinación (24h), permite sugerir que las formas de P2 son más requeridas en este estado celular del eje embrionario que las formas de P1. Este grado de fosforilación diferencial y la concentración de las formas fosforiladas de cada péptido P1 y P2 podrían conferir a los ribosomas capacidad específica para regular la actividad del tallo ribosomal en la velocidad de traducción de los mARNs (Ballesta, et. al., 1999) y/o la funcionalidad del ribosoma (Zambrano, et. al., 1997) lo que podría determinar o coadyuvar un patrón específico de traducción en los ejes embrionarios de maíz durante la germinación.

La fosforilación de P1 y P2 ha sido reconocida como evento relevante para la velocidad de elongación durante el proceso de traducción (MacConell & Kaplan, 1982; Saez-Robles, et. al., 1990). Trabajos previos en ejes de maíz apoyan esta sugerencia ya que han mostrado que la eficiencia en la síntesis de proteínas mejora con el aumento de la fosforilación de las PRAs en el ribosoma (Aguilar, et. al., 1998).

Experimentos previos han mostrado que las formas fosforiladas de P1 y P2 son requeridas para la actividad GTPasa del complejo subunidad 60S-eEF-2 en un sistema reconstituido. La interacción de las dos proteínas P1 y P2 con el factor eEF-2 inducen cambios conformacionales en él, que le confieren algunas propiedades específicas, lo que no ocurre si la proteína P2 está desfosforilada (Vard, et. al., 1997).

Estos reportes concuerdan claramente con los resultados obtenidos con los ribosomas en polisomas y los libres (figura 8). Los primeros mostraron que tienen PRAs con un alto grado de fosforilación, mientras que los segundos tienden a estar desfosforilados. Puesto que los ribosomas en forma de polisomas son los que están activamente participando en la traducción, se puede establecer una correlación clara entre la fosforilación de PRAs y la función de traducción de los ribosomas.

A pesar de que la presencia de ambos tipos de proteínas P1 y P2, es necesaria para la formación del tallo con P0, se ha encontrado que en levadura la dependencia de cada una varía: la proteína P2 se acumula en su forma libre en las células cuando el gen de la proteína P1 es eliminado, mientras la proteína P1 es degradada en ausencia de P2 (Zurdo, et. al., 2000). Lo que indica que P2 necesita de P1 para unirse al ribosoma y no parece que esto sea recíproco, ya que se ha encontrado que la proteína P1 es capaz de unirse al ribosoma en ausencia de P2 (Zurdo, et. al., 2000).

Lo anterior pudiera explicar el orden de aparición de las isoformas fosforiladas de los péptidos P1 y P2 en la cinética de fosforilación en los ejes durante la germinación, es decir, P1 es necesaria para iniciar la actividad ribosomal que será continuada por incremento en P2, ambas de manera aparentemente coordinada, mediante la variación en la relación de isoformas desfosforiladas / fosforiladas de cada péptido que participan en la traducción durante este período (figuras 6 y 7).

En este trabajo no se llegó a determinar la posición de los fosfoaminoácidos en la estructura primaria de los péptidos ribosomales ácidos, sin embargo se comprobó en la fluorografía que el residuo de aminoácido fosforilable es serina, como ocurre en sus análogos eucariotes, pudiendo sugerir que se trate del(os) residuo(s) más cercano(s) al dodecapéptido del carboxilo terminal, ya que este extremo se ha conservado evolutivamente en todas las especies estudiadas como *A. salina* (Van Agthoven, et. al., 1978), *S. cerevisiae* (Ballesta, et. al., 1999) e hígado de rata (Hasler, et. al., 1991), que se encuentran fosforiladas en el último residuo de serina, alrededor de la posición 100. Las proteínas P de *C. capitata* también tienen serina en posiciones equivalentes. Así el dominio carboxilo de la proteína CcP2 contiene sitios potenciales de fosforilación en ser-100 y ser-102 en la secuencia EESESEDD, mientras que CcP1 contiene la ser-105 conservada en la secuencia EESDD (Kouyanou, et. al., 1998).

A este respecto es interesante mencionar que en ejes embrionarios de maíz se localizan serinas en la posición 99 y 106 (figura 10), por lo que podría suponerse que estas posiciones son los posibles sitios de fosforilación que se observan en ejes embrionarios de maíz en el período de germinación. En cuanto a la posición de la serina 106 de maíz (último cuarto aminoácido en las secuencias) comparado con otros organismos, se hace el hallazgo de que en los organismos vegetales se presenta una serina en esta posición, mientras en mamíferos la posición equivalente muestra una glicina (figura 10). Este hecho hace una distinción marcada entre reinos, sugiriendo que durante la evolución se conservó la estructura de las PRAs en los organismos, pero dependiendo de la superioridad de la especie, ocurre una diferenciación en la estructura de las PRAS según sus requerimientos para la adaptabilidad metabólica. Pudiera sugerirse que, como entre eucariotes inferiores y superiores existen diferencias en el número de formas de P1 y P2 fosforiladas y desfosforiladas (Zurdo, et. al., 2000), entre reinos puede ocurrir una diferenciación en la posición clave de los residuos de aminoácidos fosforilados en los

péptidos ácidos pero que finalmente ejercen la misma función dentro del ribosoma que en las otras especies. La comprobación de esta suposición y la determinación de la o las posiciones fosforiladas en cada péptido ácido de ejes embrionarios de maíz se propone como una extensión futura de este trabajo.

VII. CONCLUSIÓN

Con la realización de este trabajo se logró aportar las suficientes evidencias para la caracterización individual de las proteínas ribosomales ácidas de ejes embrionarios de maíz como P2 (14.5 kDa, pl 4.2) y P1 (16 kDa, pl 4.5), así como poder diferenciarlas por su valor de pl. Además se logró demostrar el grado de fosforilación de cada una de ellas, mostrando una forma fosforilada para P1 y dos formas fosforiladas para P2. Con los datos obtenidos se consiguió referirlas con sus análogos eucariotes, y comprobar la universalidad de su estructura en el extremo carboxilo y la relevancia de su fosforilación para participar en la síntesis de proteínas. También se comprobó que las formas fosforiladas de las proteínas ribosomales ácidas P1 y P2 de ejes embrionarios de maíz, presentan un orden de aparición durante la germinación, apareciendo en los primeros 40 minutos la primera forma fosforilada de P2, siendo más tardía (255 minutos) la aparición de la segunda forma fosforilada de P2 y primera forma fosforilada de P1. Estos resultados comprueban la importancia de la fosforilación de las proteínas ribosomales ácidas *in vivo* en el ribosoma activo para la traducción, pues el proceso de fosforilación de P1 y P2 está fuertemente regulado durante la germinación.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilar, R. G. C., (1985) "La síntesis temprana de proteínas durante la germinación del embrión de maíz" Tesis de maestría (Bioquímica), Facultad de Química. UNAM.
2. Aguilar, R., Montoya, L. y Sánchez de Jiménez, E. (1998) *Plant. Physiol.* **116**: 379-385.
3. Bailey-Serres J., Vangala, S., Szick, K. y Lee, C. H. K. (1997) *Plant. Physiol.* **114**: 1293-1305.
4. Bailey-Serres J., (1998) in *A Look Beyond Transcription: Mechanisms Determining mRNA Stability and Translation in Plants.* (Eds. Bailey-Serres, J. y Gallie, D.R. Am. Soc. Plant Physiologists, Rockville, MD.) 125-144.
5. Ballesta, J.P.G. y Remacha, M. (1996) *Prog. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol.* **55**: 157-193.
6. Ballesta, J.P.G., Rodríguez-Gabriel, M. A., Bou, G., Briones, E., Zambrano, R., Remacha, M. (1999) *FEMS Microbiol. Rev.* **23**: 537-550.
7. Bargis-Surgey, P, Lavergne, J. P., Gonzalo, P. Vard, C., Filho-Cochet, O., Reboud J. P. (1999) *Eur. J. Biochem.* **262**: 606-611.
8. Beltrán E., Ortiz-López A y Sánchez de Jiménez, E. (1995) *Plant Mol. Biol.* **28**: 327-336.
9. Bewley, D. y Black M. (1994) *Seeds, physiology of development and germination.* New York. Plenum Press. 420 p ISBN 0-306-44747-9
10. Bielka, H. (1982) *The Eukaryotic Ribosome* (Springer, Berlin).
11. Bidwell, R.G.S. (1979) "Fisiología Vegetal" AGT editor S.A. México. 784 p ISBN 968-463-015-8
12. Bradford M.M. (1976) *Ana.Biochem.* **72**: 248-254.
13. Briones, M. E. R., (1993) "Caracterización de las proteínas ribosomales ácidas de ejes embrionarios de maíz". Tesis Maestría (Bioquímica) Facultad de Química. UNAM.
14. Brooker, J. D., C. P. Cheung y A. Marcus. (1977) *Protein synthesis and seed germination in: The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination.* Elsevier North Holland Biomedical Press. 347-356.
15. Bou, G., Remacha, M. Y Ballesta J.P.G. (2000) *Arch. Biochem. Biophys.* **375**: 83-89.
16. Camacho, S. C., (1995) "Efectos del deterioro en la viabilidad de semillas de maíz: alteraciones en el proceso de la traducción" Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
17. Clemons, W.M. Jr., May, J.L.C., Wimberly, B.T., McCutcheon, J.P., Capel, M.S. y Ramakrishnan, V. (1999) *Nature* **400**: 833-840.
18. Cowgill, C.A., Nichols, B. G., Kenny, J. W. Butler, P., Bradbury, E. M. y Traut, R. R. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**: 15257-15263.
19. Delaunay, J., Mathieu, & Schapira, G. (1972) *Eur. J. Biochem.* **31**: 561-564.
20. di Giuseppe, G., Wirz, A., Miceli C. (1999) *Journal of Eukaryotic Microbiology* **46**: 626-631.
21. Elkon, K., Skelly, S., Parnassa, A., Möler, W., Danho, W., Weissbach, H., y Brot, N. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**: 7419-7423
22. Gagou, M. E., Rodríguez-Gabriel, M. A., Ballesta J. P. G., Kouyanou, S. (1999) *GENE* **226**: 365-373.
23. Goddemeier, M. L., Rensing, S. A. y Feix G. (1996) *Plant Mol. Biol.* **30**: 655-658.

24. Hasler, P., Brot, N., Weissbach, H., Parnassa, A. P. & Elkon, K. B. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**: 13815-13820.
25. Hershey, J. W. (1991) *Annu. Rev. Biochem.* **60**: 717-755.
26. Hill, E. W., Dahlberg, A., Garrett, B. P., Moore, D. Schlessinger y Warner, J. R. (1990) Ed. *The ribosome. Structure, Function and Evolution.* Am. Soc. for Microbiol. Washington DC. 678 p ISBN 1-55581-020-9
27. Juan Vidales F., Saenz-Robles M.T., Ballesta J.P.G. (1984) *Biochemistry* **23**: 390-396.
28. Kouyanou, S., Gagou, M. E., Fragoulis, E. G. (1998) *Biochem. Mol. Biol. Int.* **45**: 623-633.
29. Kramer, G., Chen, S. C., Szyszka, R. y Hardesty, B. (1989) *Adv. Prot. Phosphatases* **5**: 611-633.
30. Kudlicki, W., Grankowski, N. y Gasior, E. (1976) *Mol. Biol. Rep.* **3**: 121-129.
31. Kudlicki, W., Szyszka, R., Palen, E. y Gasior, E. (1980) *Biol. Biophys. Acta* **633**: 376-385.
32. Laemmli U.K. (1970) *Nature* **227**: 680-685.
33. Lake, J. A., Henderson, E., Clark, M. W., y Matheson, A. J. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**: 5948-5952.
34. Leijonmark, M., Eriksson, S. y Liljas, A. (1980) *Nature* **286**: 824-826.
35. Lehninger, A. L., Nelson, L. D., y Cox, M. M. (2000) *Principles of biochemistry.* 3ra ed. New York : Worth Publishers, NY USA. ISBN 1-57259-153-6.
36. Liljas, A., (1991) *Int. Rev. Cytol.* **124**: 103-135.
37. Lin, A., Wittman-Leibold, B., McNelly, T. y Wool, I. G. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**: 9189-9197.
38. MacConnell, W.P., Kaplan, N.O. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**: 5359-5366.
39. Matheson, A. T., Louie, K. A., y Henderson, G.N. (1986) *Syst. Appl. Microbiol.* **7**: 147-150.
40. Mayer, A. M. y A. Poljakoff-Mayber (1989). *The germination of seeds.* Four edition. 211 p ISBN 0-08-035723-7
41. Mitsui K., Tsurugi K. (1988) *Nucleic. Acids. Res.* **16**: 3574-3575.
42. Möller, W. (1990) *The Ribosome: Structure, Function and Evolution.* Am. Soc. Microbiol., Washington, DC, 380-389.
43. Naranda T., Ballesta J.P.G. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**: 10563-105667.
44. Nierhaus, D. A. (1990) *Ribosomes and protein synthesis.* IRL Press Oxford University. 318 p ISBN 0-19-963104-2
45. Nissen, P., Hansen, J., Capel, M., Moore, P.B. y Steitz, T.S. (2000) *Science* **289**: 920 - 930.
46. Palen, E. Y Traugh, A., (1987) *J. Biol. Chem.* **262**: 3518-3523.
47. Pérez-Méndez, A., Aguilar, R., Briones, E. y Sánchez de Jiménez, E. (1993) *Plant Sci.* **94**: 71-79.
48. Pettersson, I., Hardy, S. J., y Liljas, A. (1976) *FEBS Lett.* **64**: 135-138.
49. Pilecki, M., Grankowski, N., Jacobs, J., Gasior, E., (1992) *Eur. J. Biochem.* **206**: 259-267.
50. Pilecki, M., Grzyb, A., Zien, P., Sekula, O., Szyszka, R. (2000) *J. Basic Microbiol.* **40**: 251-260.
51. Prieto, J., Candel, E. y Coloma, A. (1991) *Nucleic Acid. Res.* **19**: 1340-1346.
52. Qian, S., Zhang, J. Y., Kay, M. A., Jacobs-Lorena, M., (1987) *Nucleic Acid. Res.* **15**: 987-1003.
53. Redpath, N. T. y Proud, C. G. (1990) *Biochem. J.* **272**: 175-180.
54. Remacha, M., Santos, C., Bermejo, B., Naranda, T., y Ballesta, J.P.G. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**: 12601-12607.

55. **Remacha, M., Jiménez-Díaz, A., Bermejo, B., Rodríguez-Gabriel, M. A., Guarinos, E. y Ballesta J. P. G.** (1995) *Mol. Cell. Biol.* **15**: 4754-4762.
56. **Reyes, C.P.** (1990) *El maíz y su cultivo*. A.G.T. Editor, S.A. México D.F. 460 p ISBN 968-463-052-2.
57. **Rich B.J., Steitz J.A.** (1987) *Mol. Cell. Biol.* **7**: 4065-4074.
58. **Rodríguez-Gabriel, M. A., Bou, G., Briones, E., Zambrano, R., Remacha, M., y Ballesta, J. P. G.** (1999) *Folia Microbiol.* **44**: 153-163.
59. **Saenz-Robles M.T., Remacha M., Vilella M.D., Zinker S., Ballesta J.P.G.** (1990) *Biochim. Biophys. Acta* **1050**: 51-55.
60. **Sánchez de Jiménez E., Beltrán-Peña, E. Y Ortiz-López, A.** (1999) *Physiol. Plant.* **105**: 148-155.
61. **Sánchez Madrid F., Juan Vidales F., Ballesta J.P.G.** (1981) *Biochemistry* **20**: 3263-3266.
62. **Sánchez Madrid F., Juan Vidales F., Ballesta J.P.G.** (1981) *Eur. J. Biochem.* **114**: 609-613.
63. **Sánchez Madrid F., Reyes, R., Conde, P. y Ballesta J.P.G.** (1979) *Eur. J. Biochem.* **98**: 409-416.
64. **Sandermann, Krüger A., Kristiansen K.J.** (1979) *FEBS Lett.* **107**: 343-347.
65. **Scharf, K.D. y Nover, L.** (1982) *Cell* **30**: 427-437.
66. **S.E.P.** (Secretaría de Educación Pública del Gobierno de México) (1990) *Maíz. Manuales para educación agropecuaria*. Ed. Trillas.
67. **Sepúlveda, G. J.,** (1992) "Fosforilación in vitro de ribosomas de maíz : Características de la actividad de proteína cinasa". Tesis Maestría (Bioquímica) Facultad de Química. UNAM.
68. **Sepúlveda, G., Aguilar, R., Sánchez de Jiménez, E.** (1995) *Phys. Plant.* **94**: 715-721.
69. **Suárez, A. Z.,** (1995) "Regulación de la traducción de las proteínas ácidas ribosomales (PRAs) durante la germinación en maíz". Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
70. **Szyszk, R., Bou, G., Ballesta, J. P. G.,** (1996) *Biochim. Biophys. Acta* **1293**: 213-221.
71. **Szyszk, R.** (1999) *Folia Microbiol.* **44**: 142-152.
72. **Tchórzewski, M.m Boldyreff, B., Issinger, O. G., Grankoeski, N.** (2000) *Int. J. Biochem. & Cell Biol.* **32**: 737-746.
73. **Towbin, H., Staehelin, T., y Gordon, J.** (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**: 4350-4354.
74. **Uchiumi, T., Wahba, A. J., and Traut, R. R.** (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**: 5580-5584.
75. **Uchiumi, T., Traut, R. R., Elkon, K., y Komonami, R.** (1991) *J. Biol. Chem.* **266**: 2054-2062.
76. **van Agthoven, A., Kriek, J., Amons, R. y Möller, W.** (1978) *Eur. J. Biochem.* **91**: 553-556.
77. **Vangala, S., Bailey-Serres, J.** (1995) *Plant Physiol.* **109**: 721.
78. **Vard, C., Guillot, D., Bargis, P., Lavergne, J.P. y Reboud, J.P.** (1997) *J. Biol. Chem.* **272**: 20259-20262.
79. **Warner, J. R.** (1989) *Microbiol. Rev.* **53**: 256-271.
80. **Wigboldus, J. D.,** (1987) *Nucleic Acid. Res.* **15**:10064-10071.
81. **Wittmann-Liebold, B., Köpke, K. E. A., Arndt, E., Krömer, W., Hatakeyama, T. y Wittmann, H. G.** (1990) Sequence comparison and evolution of ribosomal proteins and their genes. In *The Ribosome Structure, Function and Evolution* (E. W. Hill, A. Dahlberg, A. R. Garriet, B. P. Moore, D. Shlessinger y J. Warner, eds.). American Society for Microbiol. Washington, DC. **ISBN 1-55581-020-9**
82. **Wool, I. G.** (1979) *Annu. Rev. Biochem.* **48**: 719-754.
83. **Wool, I. G., Chan, Y. L., Glück, A., y Suzuki, K.** (1991) *Biochimie.* **73**: 861-870.
84. **Zambrano, R., Briones E., Remacha, M., y Ballesta, J.P.G.** (1997) *Biochemistry* **36**: 14439-14446.

85. Zinker S., Warner J.R., (1976) J. Biol. Chem. **251**: 1799-1807.
86. Zinker S. (1980) Biochim. Biophys. Acta **606**: 76-82.
87. Zurdo, J., Sanz, J. M., González, C., Rico, M y Ballesta, J.P.G. (1997) Biochemistry **36**: 9625-9635.
88. Zurdo, J., González, C., Sanz, J. M., Rico, M y Ballesta, J.P.G. (2000) Biochemistry **39**: 8935-8943.
89. Zurdo, J., van den Berg, A., Parada, P., Nusspaumer, G., Jiménez-Díaz, A., Remacha, M. y Ballesta, J.P.G. (2000) Biochemistry **39**: 8929-8934.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

IX. ANEXO A

COMPOSICIÓN DE SOLUCIONES

Buffer de extracción B1 (50 mM Tris-HCl, pH 8.2, 50 mM KCl, 5 mM de acetato de magnesio, 250 mM sacarosa y 5 mM de β -mercaptoetanol).

Buffer de extracción B2 (0.2 M Tris-HCl, pH 9.0, 0.2 M KCl, 35 mM de cloruro de magnesio, 25 mM de EGTA, 0.2 M sacarosa, 100 mM de β -mercaptoetanol, 80 mM β -glicerofosfato, 0.5 mg / mL de Heparina, 2% de PTE, 2 mM Benzamidina y 1 mM PMSF)

Buffer B3 (100 mM Tris-HCl, pH 7.4, 80 mM KCl, 12 mM $MgCl_2$ y 5 mM β -mercaptoetanol)

Buffer B4 (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1.5 M NH_4Cl , 20 mM $MgCl_2$ y 3 mM β -mercaptoetanol)

Buffer B5 (Tris HCl pH 6.8 0.05 %; SDS 1 %; β -mercaptoetanol 1 %; EDTA 0.02 M; Glicerol 1.0 %; azul de bromofenol 0.002%, urea 8 M)

Buffer B6 (20 mM HEPES-KOH, pH 7.6, 5 mM de acetato de magnesio, 125 mM de acetato de potasio y 6 mM de β -mercaptoetanol).

Buffer de elución (0.1 % SDS, 0.05 M Tris-HCl pH 7.9, 0.1 mM EDTA, 5 mM DTT, 0.15 M NaCl y 1 % Tritón X-100)

Solución anódica I de transferencia (Tris 0.3 M pH 10.4, 20% de metanol v/v)

Solución anódica II de transferencia (Tris 25 mM pH 10.4, 20% de metanol v/v)

Solución catódica III de transferencia (6-amino-n-hexen caproico 10 mM pH 7.2, 20% de metanol v/v)

Solución de saturación (0.05% v/v Tween 20 leche descremada 5%)

TBS (Tween Base Salt) 0.15 M (NaCl 0.15 M, Tris·Cl 10 mM, Tween 20 0.05% (v/v))

TBS (Tween Base Salt) 1 M (NaCl 0.15 M, Tris·Cl 10 mM, Tween 20 0.05% (v/v))

IX. ANEXO B

OBTENCIÓN DE POLISOMAS Y NO POLISOMAS

(J. Cell. Biol. 91: 545-550 (1981); Plant. Mol. Biol. 28:327-336 (1995)).

Se tomaron 0.75 g de ejes embrionarios y se homogeneizaron con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino que es resuspendido en 6 volúmenes de buffer de extracción B2 (0.2 M Tris-HCl, pH 9.0, 0.2 M KCl, 35 mM de cloruro de magnesio, 25 mM de EGTA, 0.2 M sacarosa, 100 mM de β -mercaptoetanol, 80 mM β -glicerofosfato, 0.5 mg / mL de Heparina, 2% de PTE, 2 mM Benzamidina y 1 mM PMSF). Se homogeneiza y se centrifuga a 10,000 RPM a 4 °C por 2 minutos (rotor JA-20, 12,000 g), se extrae el sobrenadante y se deja reposar en hielo 15 minutos, se centrifuga nuevamente a 10,000 RPM por 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante se centrifuga a través de un gradiente de sacarosa (15 – 30 %) en buffer B2, en proporción de 1 mL de sobrenadante / 11 mL de gradiente) por 4 h a 4 °C a 37,000 RPM (rotor Beckman SW 40 Ti, 200,000 g).

Las fracciones de 0.4 mL se colectan en cada tubo comenzando desde la superficie (15 %) hacia el fondo (30 %) y se registra su absorbancia a 260 nm.

De acuerdo con la gráfica obtenida de absorbancia vs. fracción (fig. BI), se eligen las fracciones de polisomas y no polisomas, se reúnen y se diluyen con buffer de extracción B2 hasta una concentración de 0.5 M de sacarosa, tras lo cual se centrifugan por 3 h a 4 °C a 50,000 RPM (rotor Beckman 60 Ti). Los sedimentos corresponden al pellet polisomal y no polisomal, respectivamente.

La figura BII indica la concentración de sacarosa a la que se recuperan los polisomas.

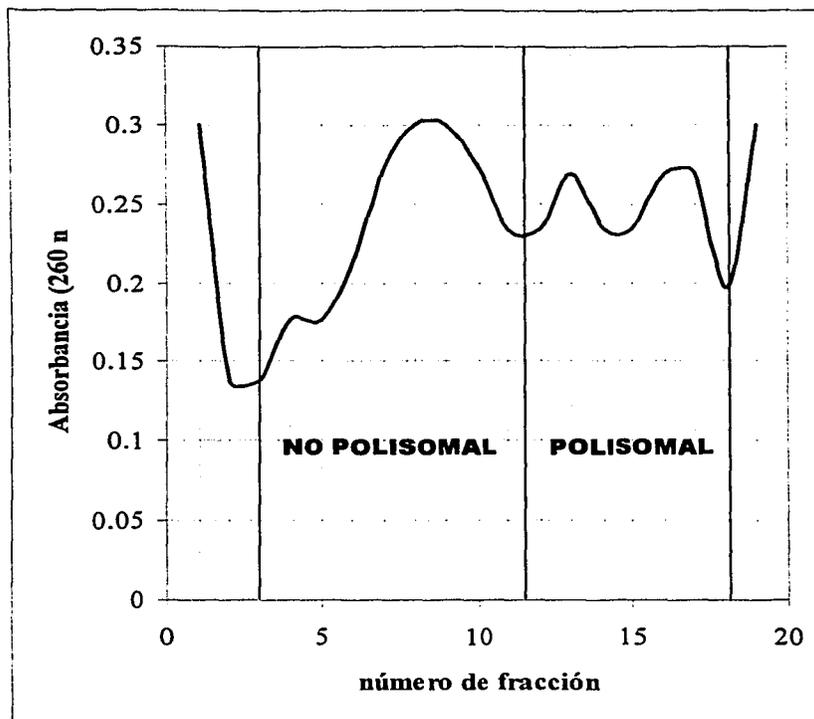


Figura BI. Perfil de sedimentación de las fracciones polisomal y no polisomal.

Se indican las fracciones colectadas, designadas en gradientes de sacarosa (15 - 30%) como polisomales y no polisomales, las que fueron reunidas y recuperadas mediante centrifugación posterior.

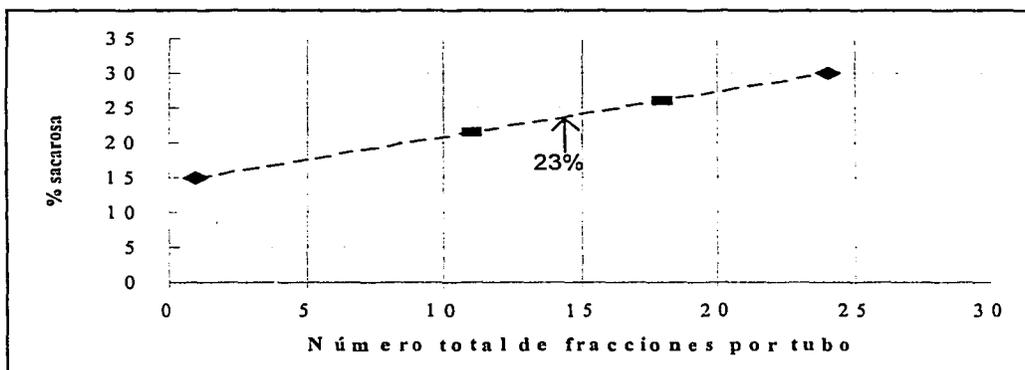


Figura BII. Estimación lineal promedio de la concentración de sacarosa (%) a la cual se obtienen los polisomas.

Se realizó con el objeto de emplear la concentración estimada en posteriores ensayos específicos para la obtención de esta fracción sin el uso de gradiente. Nótese que 23% de sacarosa es la concentración promedio estimada, equivalente a 0.67 M, la cual fue empleada en la metodología (punto 4).