



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

Columnas para el Aislamiento de
Receptores Auxínicos.



T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

Q U I M I C O

P R E S E N T A :

Laura Josefina Pérez Flores

1980

M-42476



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.

A mis padres:

Porque me han apoyado en todo momento

Porque me han permitido realizarme

Porque su estímulo contribuyó enormemente en la realización de este trabajo.

Por su ejemplo.

A la Dra. Marta Albores Velasco.

Por sus enseñanzas y estímulo durante la realización de este trabajo. Por su valioso ejemplo.

A la Dra. Estela Sánchez de Jiménez.

Por su apoyo y confianza para realizar este proyecto.

Al Dr. Blas Lotina.

Por su colaboración en el presente trabajo.

Deseo agradecer también:

A las personas que han colaborado en el desarrollo de este trabajo, principalmente a los miembros del Laboratorio 202 en donde se realizó, por su amistad y estímulo.

Al Maestro Eduardo Marambio por sus valiosas sugerencias.

A todos los que han contribuido a mi formación, principalmente a:

Mis familiares.

Alma, Emily y Angelina por haberme apoyado en todos estos años, por su valiosa amistad.

Emperatriz, Natalia, Andrea, Nadia, Mirna, David, Sergio, Bertha y Gerardo, por su amistad.

Adolfo (Por que un buen amigo no se olvida).

" A Charly" por su amistad, por sus críticas que mucho me han ayudado.

Alberto, Marcelo y Laura, por su amistad, por sus inquietudes.

Los hombres de ciencia no pueden constituirse en una pequeña élite separada de los hombres y de las contingencias prácticas; como miembros de la gran comunidad de los trabajadores deben preocuparse del uso que se hace de sus descubrimientos.

Frédéric Joliot-Curie.

La toma de conciencia del investigador en tanto que trabajador científico, luchando por los mismos intereses y objetivos que los demás trabajadores, ..., es el resultado del proceso de inserción de la ciencia en la producción, como factor estratégico de crecimiento al servicio de las clases dominantes y de la situación de clase del científico en el proceso productivo, sirviendo a otros intereses que los de aquellas personas que deberían ser las verdaderas beneficiarias de la ciencia.

Joan Senent-Josa.

INDICE

	Página
I. Introducción	1
II. Antecedentes.	2
1. Auxinas.	2
2. Relación entre estructura y actividad	3
3. Mecanismo y modo de acción.	10
4. Receptores de auxinas.	13
5. Cromatografía de afinidad.	16
a) Diversidad de soporte	
b) Activación y acoplamiento del soporte	19
c) Cuantificación del ligando acoplado.	21
d) Aplicación del Método de Cromatografía de afinidad al aislamiento de receptores hormonales.	21
III. Resultados y Discusión.	29
IV. Parte Experimental.	41
V. Resumen y Conclusiones.	55
VI. Bibliografía	57

INTRODUCCION

I. INTRODUCCION

Los estudios del mecanismo de acción de las auxinas a nivel molecular, coinciden en que en dicho mecanismo interviene uno o más receptores, aparentemente de tipo proteico. En trabajos anteriores se han detectado dos tipos de receptores auxínicos, los receptores "solubles", es decir, aquellos que se encuentran en el sobrenadante celular después de centrifugar a altas velocidades y los receptores unidos a fracciones membranales; sin embargo la localización y caracterización de estos receptores no está aún bien establecida - (14-25).

Se ha descrito también el aislamiento de factores que estimulan la transcripción, mediante la técnica de Cromatografía de Afinidad, usando la auxina ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4 D), como ligando (13,26).

Por otra parte, se ha informado que el ácido 2-(2-metil,4-clorofenoxi)propiónico (MCP) es más eficaz que el 2,4 D en la inducción auxínica del crecimiento de callos de trigo, centeno y maíz (27,28). Una explicación a las diferentes respuestas a estos compuestos es que éstos tengan diferente afinidad por el receptor.

Con base en estos estudios, en el presente trabajo se describe la preparación de columnas de cromatografía de afinidad que tienen como ligandos 2,4 D y MCP, las cuales se usarán posteriormente para aislar los receptores auxínicos.

ANTECEDENTES

II. ANTECEDENTES

1. Auxinas.

La idea de que el desarrollo de las plantas está controlado por hormonas vegetales, está considerada en los trabajos efectuados por Darwin a fines del siglo pasado, sin embargo, no es sino hasta el presente siglo que los estudios sobre fitohormonas se han incrementado notablemente. En la actualidad se ha demostrado que el control total de una planta no se debe a un solo tipo de hormona sino que es el resultado de la interacción de todas ellas (auxinas, giberelinas, citocininas, ácido abscísico y etileno).

Las auxinas, que fueron las primeras hormonas vegetales que se aislaron, son las fitohormonas más estudiadas. Además del ácido indol-3-acético (AIA) y algunos de sus derivados que se encuentran en las plantas, se han descubierto, como resultado de la investigación en esta área, un gran número de compuestos sintéticos que poseen actividad similar a las auxinas naturales. Entre las "auxinas sintéticas" pueden mencionarse el grupo de los fenoxiácidos, ácidos arilacéticos, derivados del naftaleno, ácidos cinámicos, etc. (1, 3, 4, 6).

La acción más característica de las auxinas es la de promover la elongación celular; de hecho, varias pruebas de determinación de actividad auxínica se basan en esta respuesta. (1).

Además de este efecto se ha observado que estas hormonas intervienen en los siguientes procesos: división y diferenciación celular, estimulación de la formación de raíces, inhibición de la elongación de raíces, dominancia apical e inhibición de brotes; inicio de la floración, maduración de frutos, etc. (1, 2, 8).

En la actualidad, las auxinas sintéticas se usan ampliamente en Agricultura para controlar la floración, la maduración de frutos, para aumentar el establecimiento de injertos, etc. Se ha observado además que al aplicar dosis altas de estos reguladores del crecimiento se provoca la muerte de la planta debida a un crecimiento incontrolado, sin embargo, esta acción no se ejerce por igual en diferentes especies vegetales y es por ello que estos compuestos se pueden emplear como herbicidas selectivos en la Agricultura. Herbicidas de este tipo, como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4 D), ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5 T), ácido 2-metil,4-clorofenoxiacético (MCPA), etc, se han aplicado con buenos resultados en el control de malezas en cultivos de maíz, trigo, arroz, avena, chicharo y soya entre otros. (1,2).

2. Relación entre estructura y actividad.

El establecimiento de una teoría que relacione la estructura con la actividad de estos compuestos es de gran importancia, pues ayudaría a conocer el mecanismo de regulación del crecimiento vegetal y además tendría un gran significado práctico para la industria agrícola, ya que se podrían sintetizar nuevos compuestos con actividad similar o superior a la de los compuestos conocidos.

Hasta la fecha se han propuesto diversas teorías que intentan establecer dicha correlación. A continuación se mencionan algunas de ellas, así como sus principales objeciones.

Muir y Hansch elaboraron en 1951 la teoría de los dos pun-

tos de contacto(4-6),tratando de explicar de esta manera la inac tividad mostrada por los ácidos fenoxiacéticos sustituidos en - las posiciones 2 y 6.Los autores de esta interpretación proponen la formación de un complejo entre la auxina y el receptor, en el que intervienen el grupo carboxílico y una posición orto a la ca dena lateral de la primera y un grupo cisteínico de la proteína, en un modo de adición por dos puntos.(Fig.1).Existen algunos com puestos activos, como el ácido 2,4,6-trimetilfenoxiacético, que po nen en duda esta interpretación, pues para explicar su actividad se requiere pensar en el desplazamiento de los sustituyentes, lo cual parece improbable.Otra objeción a esta teoría es el hecho de que los enlaces propuestos no pueden explicar la especificidad - de las auxinas pues ésta solo se explica cuando existen un gran - número de interacciones débiles del tipo de atracciones de van - der Waals. (4)

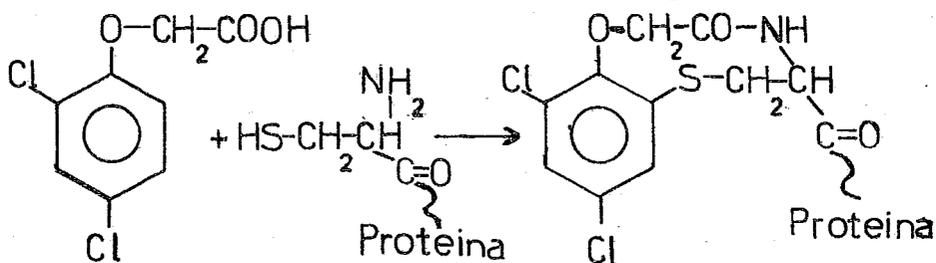


Fig.1 Modelo de Hansch y Muir con dos puntos de contacto ilustrado con 2,4 D.

La teoría de los tres puntos de contacto establecida por Smith y Wain (6), propone la necesidad de un sistema anular in saturado, un grupo carboxilo y un hidrógeno en el carbono α al carboxilo en la molécula activa. Este modelo sugiere un receptor estereoespecífico que se asocia solo a uno de los enantiómeros, explicando así la actividad de aquellos compuestos en que solo uno de los isómeros es activo; sin embargo es incapaz de explicar la actividad de los ácidos arilbenzoicos, los distintos patrones de sustitución de varias auxinas sintéticas y el hecho de que para algunos compuestos como el ácido 2(3-indol) propiónico, ambas formas son activas (5, 6) (Fig. 2).

O=carboxilo

P=anillo

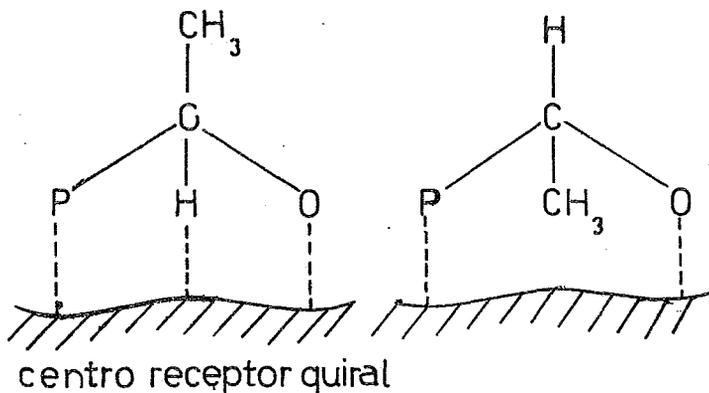


Fig. 2. Modelo de tres puntos de contacto de Smith y Wain.

La teoría de la separación de cargas propuesta por Thimann y Porter (6,7), considera que para que una molécula posea actividad auxínica, se requiere una carga parcial positiva, que ellos localizan en el átomo de nitrógeno del AIA, situada a una distancia de 5.5 \AA de la carga negativa del oxígeno del carboxilato. (Fig. 3). La actividad mostrada por el ácido 1-indolacético (distancia entre N y O de 3.2 \AA) y el ácido 4-indolacético (distancia entre N y O de 7.3 \AA) refutan esta teoría. Cálculos recientes de orbitales moleculares indican que el nitrógeno del AIA no posee una carga parcial positiva como se proponía sino que tiene una carga parcial negativa, pero que una posición del anillo si posee la carga parcial positiva. En base a estos resultados Farrimond, Elliot y Clack (8) han modificado esta teoría proponiendo que los compuestos activos poseen una carga parcial positiva en un átomo del núcleo, situada a una distancia de 5 \AA aproximadamente del oxígeno del carboxilo.

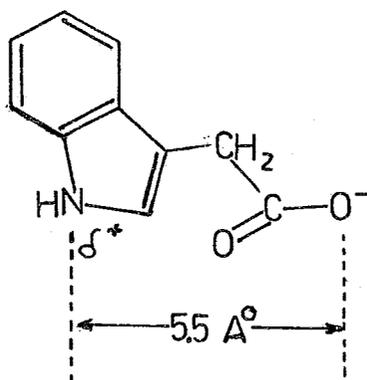


Fig. 3 Modelo de la separación de cargas.

La teoría del cambio conformacional propuesta por Kaethner sugiere que existe una conformación de reconocimiento planar y que posteriormente ocurre un cambio conformacional en el receptor y en la molécula que interactúa. Las moléculas activas deben ser capaces de sufrir un cambio conformacional análogo. (fig. 4) Cálculos de orbitales moleculares de ácidos fenilacéticos, indican que la conformación más estable no es la de reconocimiento, más aún si se supone una distribución de Boltzmann, solo un 0.5% de las moléculas tendrían la conformación requerida para ser "reconocidas", por lo que esta teoría no explica la actividad de estos compuestos. (8). Tampoco puede explicar el hecho de que el ácido 4-cloro-3-indolacético, que de acuerdo a este modelo se esperaría fuese poco activo por impedimento estérico en la conformación de reconocimiento, tenga mayor actividad que el mismo AIA. (6).

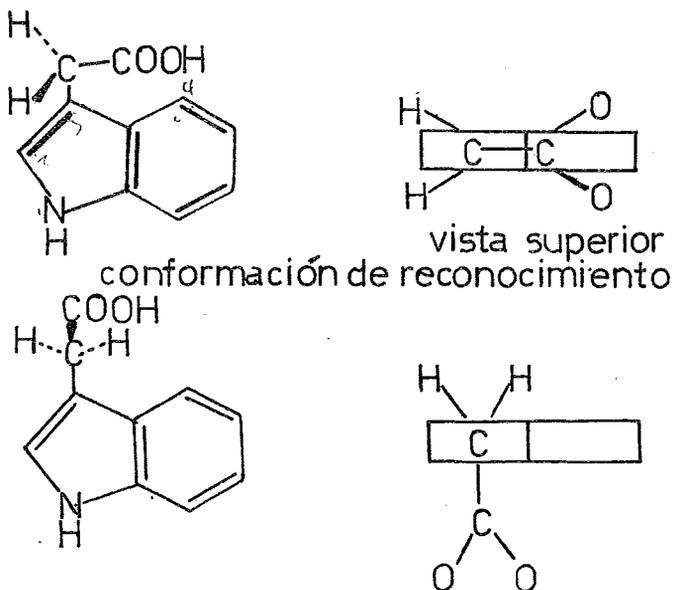


Fig. 4 Modelo del cambio conformacional.

Recientemente Katekar (6), ha establecido una nueva correlación estructura-actividad para compuestos auxínicos. Este modelo se basa en la consideración de que el sitio receptor es complementario a la molécula de AIA. Se propone que el área que acepta al núcleo indólico es de naturaleza electrofílica y que puede interactuar con los electrones π del anillo o con átomos ricos en electrones, además se sugiere que esta área se extiende más allá de los límites del anillo. Esta área se subdivide a su vez en áreas Ar_1 y Ar_2 que corresponden a las porciones pirrólica y bencénica respectivamente de la molécula (Fig. 5). Las áreas que rodean al núcleo indólico se designan con las letras a-f. El área que corresponde al metileno del AIA se designa como área alfa y a la porción que interactúa con el grupo carboxilo se le nombra aceptor carboxílico. El análisis de derivados del AIA, así como de gran número de compuestos activos indican que a pesar de que el sitio receptor es lo suficientemente grande e inespecífico para aceptar las diversas auxinas sintéticas, existen limitaciones de tamaño y forma que restringen la interacción de moléculas que de otra manera se esperaba fuesen activas. Los datos de actividad sugieren que existen impedimentos estéricos en la zona que queda entre las áreas c y d y también en las áreas a y f. Se propone también que los requerimientos conformacionales del aceptor carboxílico son altamente específicos de manera que pueden determinar la forma en que el resto de la molécula interactúa con el receptor. Se considera que el área alfa ejerce un efecto estérico. Es en base a este último efecto que este modelo explica la actividad de un solo isómero en algunos com-

puestos, así como las excepciones encontradas. De esta manera este modelo explica la actividad de los análogos de auxina, de acuerdo a la capacidad que tienen para interactuar con el receptor. Este modelo logra explicar un gran número de compuestos activos; sin embargo es necesario un estudio exhaustivo de los compuestos activos que se conocen para poder comprobarlo.

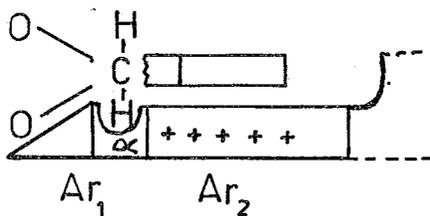
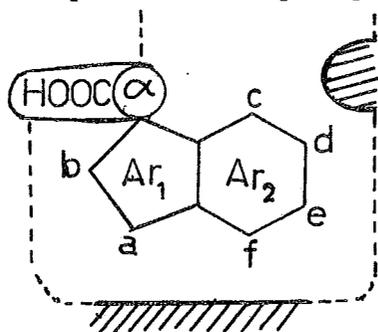


Fig. 5 Modelo de Katekar.

3. Mecanismo y modo de acción.

Cuando se aplica una fitohormona a un sistema vegetal sensible, se produce un cambio específico que provoca un efecto fisiológico o bioquímico medible. La interacción molecular de la hormona en su sitio de acción se conoce como mecanismo de acción, en tanto que la secuencia de reacciones que provoca la hormona y que llevan al efecto fisiológico se conocen como modo de acción. (2).

Los estudios a nivel celular del modo de acción de las auxinas indican que éstas intervienen en el metabolismo de ARN. Los núcleos aislados de hipocotilos de soya pretratados con auxinas, muestran un nivel de transcripción más alto que los que se aislaron de hipocotilos sin tratar. (9). Estos efectos se han asociado con un aumento en la capacidad de síntesis de ARN dependiente de las ARNpolimerasas I y II. La adición de auxinas incrementa la actividad de la polimerasa I y provoca modificaciones en la polimerasa II (9). Los experimentos realizados para estudiar la regulación metabólica del ARN por auxina "in vivo", han demostrado que en muchos tejidos la hormona produce un incremento en ARN. (1-3, 10). Experimentos en coleoptilos de avena y en raíces de lenteja parecen indicar que uno de los primeros efectos de la auxina es el de incrementar el nivel de ARN mensajero. (9).

Para explicar el modo por el que las auxinas inducen la elongación celular se han elaborado varias teorías.

Se sabe que para que la célula pueda elongarse, la pared ce

lular debe relajarse y que la fuerza motora que produce la elongación celular, es la presión de turgencia que ejerce el protoplasto sobre la pared debida al gradiente de concentración. Así, cuando se habla de elongación celular inducida por auxinas, va implícita la relajación de la pared celular inducida por auxinas. (Masuda, 11). El relajamiento de la pared celular puede deberse al rompimiento de enlaces entre los polisacáridos que la constituyen, o bien a un cambio en su formación.

Inicialmente se creía que las auxinas actuaban en la elongación celular controlando el tipo de proteínas que se producían en las células (1), sin embargo, al observarse que la respuesta de elongación inducida por auxina se iniciaba en un periodo de tiempo menor al tiempo en que se incrementaba la síntesis de ARN, hizo pensar en que debía existir otro mecanismo, al menos para la respuesta a corto plazo (1). Para la continuación del crecimiento en un lapso mayor de tiempo, deben intervenir otros factores, entre los que podría estar el efecto de la auxina en el metabolismo del ARN.

Debido a las pruebas que indican que el sitio primario de acción de las auxinas no se encuentra en la pared celular, sino más bien en una membrana interna o en el citoplasma, se ha llegado a la conclusión de que debe existir un "mensajero" químico que comunique dicho sitio con la pared celular y que permita la respuesta de elongación rápida. A este factor se le conoce como factor de relajación de la pared. (12). Experimentos realizados de manera independiente por Hager y Rayle & Cleland, indican que di-

cho factor es el ión H^+ . Este descubrimiento llevó a la teoría del crecimiento ácido. (12).

Esta teoría propone el siguiente mecanismo para la respuesta rápida: la auxina llega a su sitio de acción en la célula y al interactuar con él provoca la expulsión de iones H^+ a la pared, que hacen que pH disminuya. En la pared se encuentran enzimas "relajantes" de la pared que tienen pH óptimo ácido, las cuales se activan rompiendo algunos enlaces entre los polisacáridos que constituyen la pared.

Experimentos realizados por estos investigadores en coleoptilos de avena, dan resultados que apoyan esta teoría (12). Entre estos se pueden mencionar:

-La inducción de la elongación celular por auxinas se puede sustituir por protones exógenos, dando velocidad de elongación similar. En este experimento se trabajó con coleoptilos sin cutícula debido a que se probó que ésta actúa como una barrera al paso de protones.

-Los coleoptilos sin cutícula producen una disminución en el pH externo en respuesta a la auxina, lo cual prueba que se excretan protones.

-Un buffer con pH mayor que 6 en el medio externo inhibe la elongación celular inducida por auxina, en coleoptilos sin cutícula.

4. Receptores de auxinas.

Para establecer el mecanismo de acción de las auxinas, se han realizado gran cantidad de estudios para aislar los receptores celulares. Hasta la fecha se han detectado receptores auxínicos unidos a membrana en distintos tejidos como plántulas de chicharo y maíz (13), coleoptilos de maíz (14-22) e hipocotilos de soya. La localización de estos receptores no está bien establecida. Existen informes de la localización de estos receptores en la membrana de retículo endoplásmico (sitio I) (17,19,20,21). Un segundo sitio de unión se ha encontrado en el tonoplasto o membrana vacuolar (sitio II) (19,21) y en la membrana plasmática o plasmalema (sitio III) (14-16,21,23).

Se ha informado además de la presencia de un factor soluble en tejido de maíz, que modifica la afinidad de estos receptores por las auxinas probadas. Este factor soluble se ha identificado como una mezcla de benzoxazolinonas, sin embargo su papel "in vivo" no está muy claro, debido a que se ha observado que se encuentra en la planta solo después de que ésta ha sufrido daño físico. (20,24).

Existen también trabajos que sugieren la existencia de receptores solubles, es decir, receptores que no están firmemente unidos a membrana u otros organelos y que, por lo tanto, se encuentran en el sobrenadante celular después de centrifugar a altas velocidades. Estos receptores se han aislado de endospermo de coco, plántulas de frijol y callos de tabaco. (24,25).

Libbenga (24) ha propuesto un modelo de acción de auxina -

en el que asocia los receptores unidos a membrana a la respuesta de elongación rápida. Propone un receptor móvil que de esta manera puede actuar sobre alguna ATPasa y permitir que se active la bomba de protones. Esto explicaría los resultados encontrados de que estos receptores membranales no tienen actividad ATPasa en si mismos. (18), como sería de esperar para la bomba de protones propuesta por la teoría del crecimiento ácido.

Por otra parte se propone que los receptores solubles están implicados en la regulación auxínica del metabolismo de ARN. De acuerdo a este modelo, la hormona se une a un receptor soluble. El complejo receptor-hormona formado, se une a un aceptor en el núcleo que puede ser una proteína no histónica de la cromatina, que sería la responsable de la respuesta observada. Este modelo explicaría el hecho de que núcleos aislados no presentan respuesta a auxina (2,24), debido a que el aceptor requiere reconocer al complejo receptor-hormona.

Sin embargo para poder llegar a conclusiones respecto a la validez de este modelo, se necesitan mayores estudios que lo apoyen, como sería una caracterización del receptor soluble, así como probar su papel en el metabolismo de ARN.

Existen dos trabajos que describen el aislamiento de fracciones proteicas que estimulan la síntesis de ARN con ARN polimerasa de E. coli. Este aislamiento se logró mediante la técnica de Cromatografía de afinidad, es decir haciendo pasar homogenizados de raíces de chicharo ó maíz (13) e hipocotilos de soya (26) a través de columnas de sefarosa acopladas a 2,4 D (ácido

2,4-diclorofenoxiacético). Estos trabajos presentan una nueva - perspectiva para poder probar los modelos de acción auxínica - propuestos.

Experimentos efectuados para probar la inducción auxínica de callos de trigo y centeno indican que el ácido 2(2-metil-4-clorofenoxi)propiónico (MCPP), es más eficiente que el 2,4 D(27). Asimismo los estudios del efecto de análogos del 2,4 D, en cultivos de tejidos de maíz, demuestran que dichos análogos, (entre - ellos el MCPP), son mejores en la inducción y mantenimiento del crecimiento de callos(28). Estos datos han llevado a la conclusión de que el MCPP es un factor de crecimiento más eficaz que el 2,4 D en el cultivo de células de células de cereales(27).

También se ha medido la afinidad de 2,4 D y MCPP por cromatina de trigo y se encontró que ambas auxinas la solubilizan; - aunque la concentración de 2,4 D requerida para disolver una - cantidad dada de cromatina es mayor que la que se emplea de MCPP. Una explicación de estos resultados sería que hubiera diferentes vías metabólicas para estos análogos. Sin embargo, los experimentos realizados en este sentido en callos de maíz, no muestran diferencias significativas en el metabolismo de 2,4 D y MCPP(29). Otra explicación de estos resultados sería que estos compuestos poseen diferentes afinidades por el receptor.

La información antes indicada, así como las ventajas que - ofrece la técnica de cromatografía de afinidad y que a continuación se enuncian, hicieron pensar en la aplicación de esta técnica en el aislamiento de receptores auxínicos, usando como ligandos 2,4 D y MCPP.

5. Cromatografía de Afinidad.

Los procedimientos clásicos de aislamiento y purificación de proteínas, se basan en las pequeñas diferencias en propiedades que éstas muestran en mezclas. En general estos métodos son muy laboriosos, incompletos y de bajo rendimiento.

Una técnica más reciente para la purificación de proteínas es la Cromatografía de afinidad, la cual se basa en la interacción específica de un ligando con una proteína o macromolécula. El ligando se une covalentemente a un soporte insoluble y con esto se empaca la columna a través de la cual se pasará la mezcla de proteínas. En principio, solo la proteína con alta afinidad por el ligando, se retendrán en la columna, mientras que las demás pasarán libremente. La elución de la proteína se puede lograr mediante la modificación de la concentración salina, el pH o bien agregando un ligando competitivo. (30).

La rapidez del método de cromatografía de afinidad, ayuda a preservar la proteína de inhibidores, contaminantes destructivos como proteasas y evita su desnaturalización, por estabilización de la estructura terciaria.

El éxito de esta técnica dependerá de cuanto se asemejen las condiciones experimentales escogidas, a la interacción de la proteína y el ligando libres en solución.

Para semejar dicha interacción, se deben cumplir las siguientes características:

-El ligando no debe sufrir modificaciones en el transcurso del experimento pues afectaría la especificidad de la interacción.

-El impedimento estérico que el soporte impone al ligando debe ser minimizado.

-El soporte debe ser estable en las condiciones en que la proteína no se desnaturaliza.

Además el "soporte ideal" debe tener las siguientes características(31):

a) Formar una malla "relajada" que permita el libre paso - de macromoléculas (la porosidad influye también en la disponibilidad de ligandos libres para la macromolécula, sobre todo - cuando la afinidad es débil).

b) Las partículas deben ser uniformes, esféricas, rígidas y conservar sus propiedades de flujo durante el experimento.

c) La interacción de esta matriz con proteínas debe ser mínima antes y después de la unión con el ligando, para evitar la adsorción no específica.

d) El soporte debe tener gran cantidad de grupos químicos que puedan activarse o ser funcionales para unirse covalente - mente a una amplia variedad de ligandos.

e) El soporte debe ser mecánica y químicamente estable en las condiciones de activación, acoplamiento, adsorción y elución.

A) Diversidad de Soportes.

Las restricciones impuestas al soporte han sido un factor limitante en la aplicación de esta técnica. A continuación se - mencionan los diversos soportes que se han empleado, así como algunas de sus características.

-Celulosa.-Se usó en los primeros trabajos con este método,

sin embargo su utilidad es limitada debido a la microheterogeneidad de las partículas, la cual provoca efectos indeseables en la capacidad de absorción.

-Poliestireno.-Tiene baja porosidad y por lo tanto limita el paso de macromoléculas de gran tamaño.

-Dextrano.-Tiene también baja porosidad.

-Poliacrilamida.-Tiene ventajas sobre otros soportes ya que se encuentra disponible comercialmente en esferas de varios tamaños, además de que posee varios grupos modificables; sus limitaciones son su baja porosidad y el encojimiento observado durante las modificaciones químicas requeridas en el ataque de ligandos.

-Agarosa.-Muestra muchas de las propiedades del soporte ideal su estructura permite el paso de macromoléculas con peso molecular de varios millones. Puede sufrir fácilmente reacciones de sustitución, cuando se activa con bromuro de cianógeno. Sus desventajas son su inestabilidad a altas temperaturas y a la aplicación de eluyentes que rompan puentes de hidrógeno.

A pesar de que no hay reglas para la selección del soporte adecuado en un caso particular, la experiencia ha demostrado que la agarosa es recomendable en la purificación de muchas proteínas, como ya se mencionó la activación de este soporte se realiza fácilmente con bromuro de cianógeno.

B) Activación y Acoplamiento del soporte.

Las reacciones que ocurren en el proceso de activación con bromuro de cianógeno y durante el acoplamiento no se conocen con exactitud. Sin embargo se han hecho estudios con celulosa y se considera que las reacciones no varían para otros polímeros hidroxílicos. Los resultados indican que durante el proceso de activación se forman imidocarbonatos cíclicos y carbamatos. De estos los imidocarbonatos cíclicos son reactivos y son los responsables del acoplamiento con grupos amino, mientras que los carbamatos son estables (Fig. 6). Aquí es importante hacer notar que el imidocarbonato cíclico activo (A) puede hidrolizarse fácilmente en medio ácido dando un carbonato cíclico (B). El tratamiento de A con base acuosa o bien una hidrólisis prologada de B, regeneran el diol vicinal de la matriz. Así, la elección del pH de acoplamiento debe ser tal que el grupo amino este libre y que el complejo activo sea estable (31).

Se ha observado que el proceso de activación de la agarosa con bromuro de cianógeno ocurre más rápidamente en valores de pH entre 10 y 12, sin embargo, durante el mismo proceso se liberan protones. Para mantener el pH requerido se han desarrollado dos técnicas. Una de ellas requiere de un pHmetro y de una titulación manual con una base para controlar el pH (32), mientras que la otra hace uso de un buffer de pH adecuado (33).

Como ya se mencionó anteriormente, para que la interacción entre el ligando y la macromolécula sea óptima, deben existir el mínimo posible de impedimentos estéricos. Para lograr esto, se ha

generalizado el uso de brazos espaciadores entre la matriz y el ligando con el fin de que este último pueda llegar al sitio activo de la macromolécula (Fig. 7).

La relación entre la longitud del brazo espaciador y la fuerza de interacción del ligando con la macromolécula es semejante para un gran número de enzimas estudiadas: observándose un máximo a una longitud del brazo de 8-10 Å (31).

C) Cuantificación del ligando acoplado.

Una vez que el ligando se ha acoplado al soporte y que éste se ha lavado para eliminar el material no unido, es conveniente determinar cuanto ligando se acopló. Para ello se pueden seguir diferentes técnicas entre las que se pueden mencionar:

-Análisis Diferencial.- El ligando acoplado se determina por la diferencia entre el ligando añadido inicialmente y el que se recupera después de lavados exhaustivos. Este método no es muy exacto.

-Espectroscopía Directa.- Si el ligando absorbe directamente en la región del ultravioleta o visible, se puede detectar directamente en el soporte sólido, lavado para eliminar lo que no se unió, una vez que se conozca la λ_{max} del ligando.

-Por análisis elemental.

-Por titulación.

-Por radioactividad, etc.

D) Aplicación del Método de Cromatografía de Afinidad al Aislamiento de Receptores Hormonales.

Además de las aplicaciones que la técnica de Cromatografía

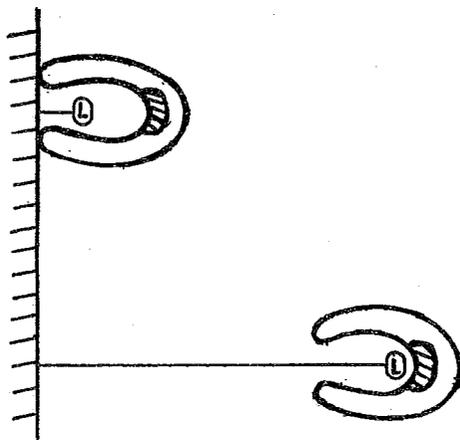


Figura 7. Uso de brazos espaciadores
(el sitio de acción se indica con líneas
diagonales en la macromolécula que inter-
acciona con el ligando (L)).

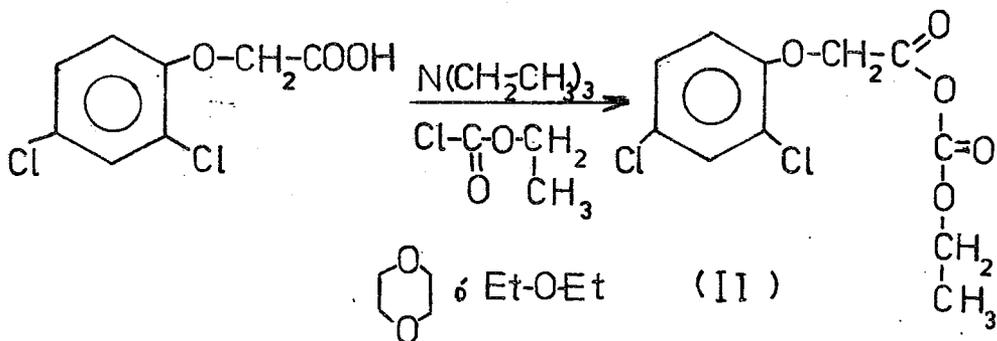
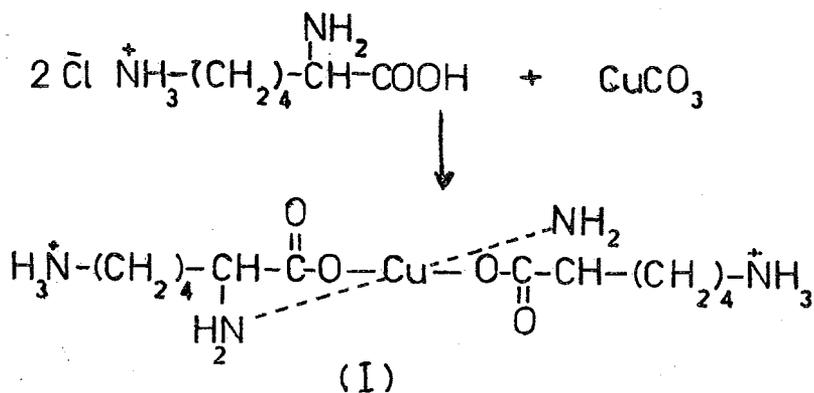
de afinidad tiene en el aislamiento y purificación de enzimas, - aislamiento de anticuerpos, etc., se encuentra otra muy importante que es el aislamiento de receptores hormonales. La interacción hormona-receptor es específica y de gran afinidad, por lo que la técnica puede aplicarse y solo limitan dicha aplicación las dificultades técnicas particulares.

Entre los receptores que se han aislado mediante esta técnica se pueden mencionar los de acetilcolina, de insulina, de glucagón, estradiol, penicilina, morfina, histamina y norepinefrina (31).

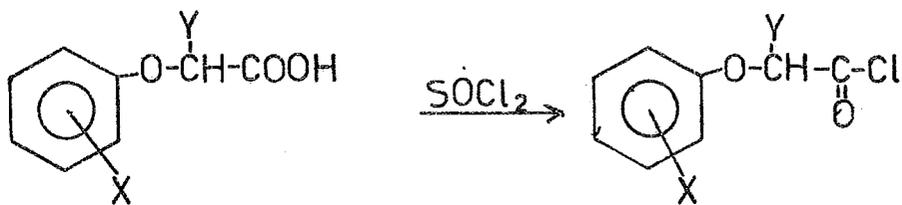
DISCUSSION

RESUMEN DE REACCIONES

Esquema A

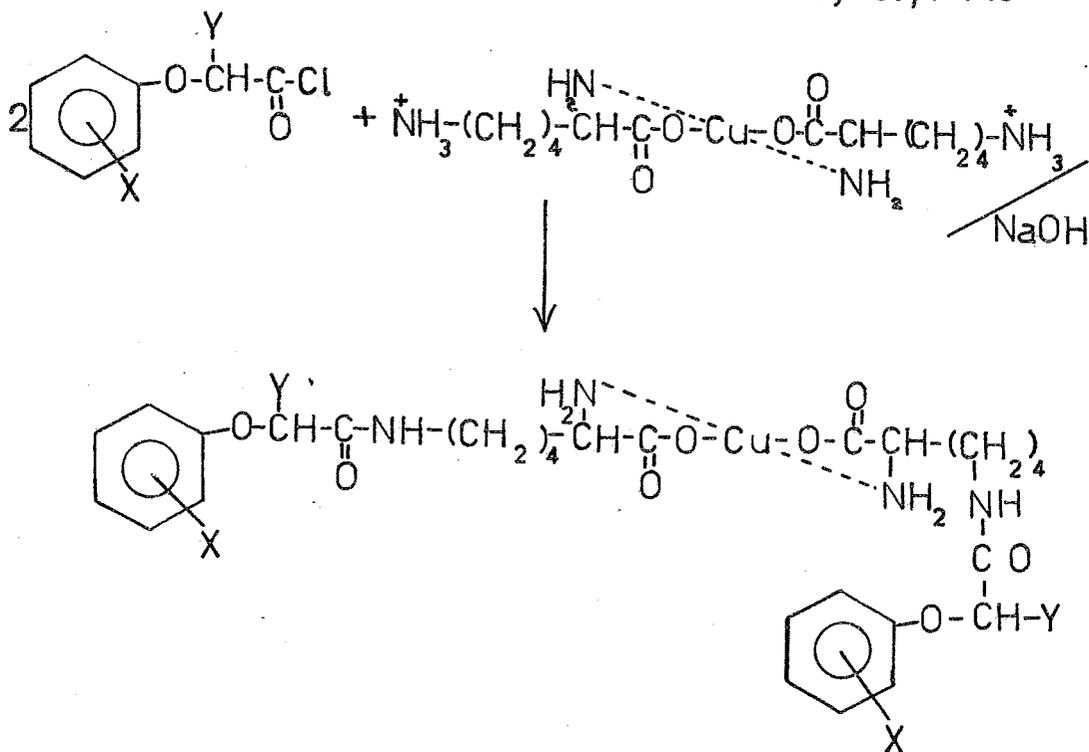


Esquema B



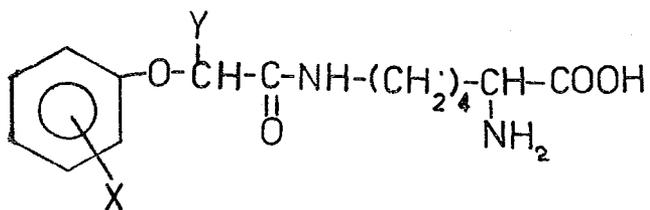
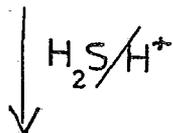
(IV): X=2,4 di Cl; Y = H

(V): X=2Me,4-Cl; Y=Me



(complejo auxina-lisina-cobre)

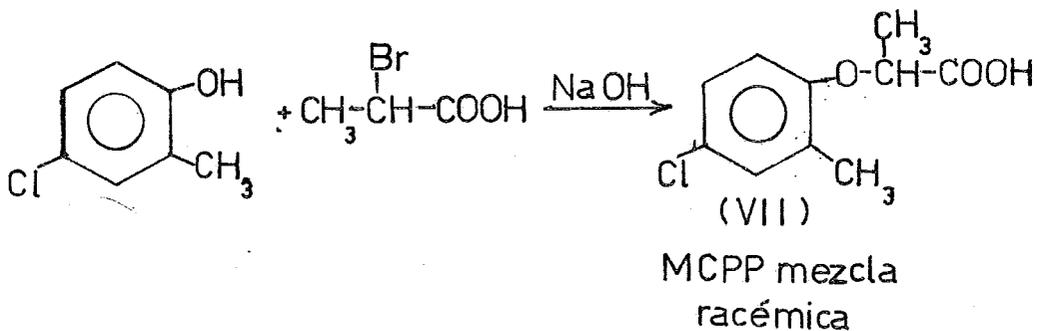
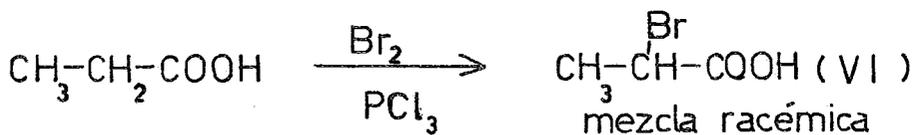
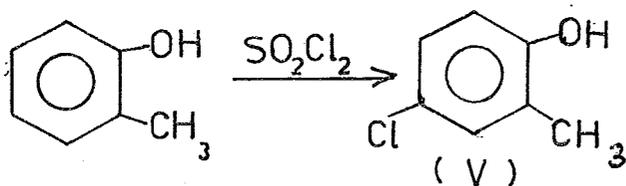
complejo auxina lisina cobre



(III): X = 2,4 di Cl, Y = H

(IV): X = 2-Me, 4-Cl; Y = Me

Preparación del MCPP



Preparación del bromuro de cianógeno



III. DISCUSION

Basándose en los estudios de los efectos del 2,4 D y MCPP en cultivo de tejidos de trigo, centeno y maíz (27, 28), así - como en los trabajos que describen el aislamiento, mediante columnas de sefarosa acopladas con 2,4 D, de factores proteicos que estimulan la transcripción; se pensó en la aplicación de la técnica de cromatografía de afinidad para el aislamiento de receptores auxínicos, empleando como ligandos los ácidos 2,4 D y MCPP.

Se pensó en estas auxinas ya que una posible explicación a las diferentes respuestas provocadas por estos compuestos en -- cultivos de tejidos, sería que tuviesen distinta afinidad por el receptor. Las diferentes afinidades de estos compuestos por la cromatina de trigo (27) apoyan esta posibilidad. Una vez aislado este receptor se debe comprobar con ácido indolacético que - se trata del receptor "normal". Como ya se mencionó anterior-- mente, la otra explicación para la mayor actividad auxínica del MCPP proponía diferentes vías metabólicas para estos productos, no ha encontrado apoyo en los experimentos realizados en los ca llos de maíz (29).

Venis y Rizzo (13, 26) reportaron el aislamiento de frac- ciones proteicas de chicharo, maíz y soya, que estimulan la - transcripción, utilizando cromatografía de afinidad con 2,4 D como ligando y el aminoácido lisina como brazo espaciador. En estos trabajos se indica que la preparación del derivado 2,4 - diclorofenoxiacetamido- ϵ -L-lisina (2,4 D-lisina), se realizó -

siguiendo la técnica descrita por Hutzinger y Kosuge (34) para la preparación del indol-3-acetil-ε-L-lisina. El método consiste en el tratamiento del ácido indol acético disuelto en dioxano con clorocarbonato de etilo para dar el carbonato, que al tratarse con el complejo lisina-cobre en medio básico, produce la amida correspondiente. En los trabajos de Venis y Rizzo (13, 26) se supone la formación de la amida correspondiente sin reportar ningún dato que indique que la caracterizaron. En este trabajo se procedió a sintetizar los derivados 2,4 D-lisina y MCPP-lisina (2(2-metil,4-clorofenoxi) propionamido lisina), siguiendo este método (Esquema A), pero tratando de aislar, purificar y caracterizar cada uno de los intermediarios y productos, para asegurar que se obtiene el ligando requerido. Esto es necesario debido a la importancia que el ligando tiene en la técnica de cromatografía de afinidad.

Para la obtención del complejo de L-lisina-cobre (I) se siguió la técnica descrita por Neuberger y Sanger (35), que consiste en tratar una solución en ebullición del L-aminoácido, con un exceso de carbonato de cobre. El exceso de carbonato de cobre añadido desplaza la reacción dando rendimientos muy altos del complejo. El espectro I.R. del producto muestra las siguientes bandas: N-H en 3400 cm^{-1} , NH_3^+ banda ancha en 3000 cm^{-1} , C-H en 2910 cm^{-1} aparece como una banda traslapada con la anterior, N-H en 1650 cm^{-1} , COO^- en 1580 cm^{-1} . El espectro visible del producto mostró una λ max. en 625 nm. siendo el valor reportado de 630 nm., esto indica que se trata del producto esperado.

La formación de este complejo de lisina con cobre tiene como -- fin enmascarar el grupo α amino del α aminoácido, dejando así libre para reaccionar el grupo ϵ amino (35).

En la obtención del anhídrido (II) se siguió la técnica - descrita por Hutzinger, ya mencionada anteriormente. Sin embargo a 0°C el dioxano (disolvente que recomienda el autor), es só lido y al agregar el clorocarbonato de etilo a la solución de 2,4 D y trietilamina en este disolvente no se observó reacción. Debido a esto se pensó en cambiar de disolvente y se decidió -- usar éter etílico. El producto se descompone por calentamiento y no puede destilarse ni aún a presión reducida. El espectro I.R. del producto crudo muestra una absorción de carbonilo en - 1750 cm^{-1} como esta descrito. El espectro de R.M.N. muestra un triplete en 1.4 ppm que integra para tres protones, acoplado con un cuadruplete en 4.35 ppm que integra para dos protones que cor rresponden al grupo etilo del ester. En 4.75 ppm aparece un sing ulete que integra para dos protones y corresponde al metileno del ácido y en la región de 6.8-7.6 ppm aparecen las señales - de protones aromáticos que integran para tres protones. Estos datos indican claramente que se obtuvo el producto esperado, -

Cuando se hizo reaccionar el anhídrido anterior (II) con - el complejo lisina-cobre (I), siguiendo la técnica ya descrita (34), se encontró que no hubo reacción, pues se recuperaron las materias primas. Las modificaciones en tiempo de reacción, dis solventes y temperatura no produjeron buenos resultados, ya que

en todas las pruebas efectuadas se recuperaron los reactivos. Es tos resultados contradicen los reportados e indican que el etil - carbonato de 2,4 diclorofenoxiacetilo (II) es muy estable ya que el carbonato no es desplazado por la amina como se esperaba. Una explicación podría ser que los pares de electrones libres del átomo de cloro de la posición dos del anillo pudiesen impedir el ataque de la amina.

Los resultados anteriores condujeron a la búsqueda de otros métodos de obtención para el 2,4-diclorofenoxiacetamidolisina -- III). Para ello se decidió adaptar el método reportado por Kurtz para la obtención de ϵ -benzoil-lisina (36, 37). Este procedimiento emplea la reacción de Schotten-Baumann para la obtención de la amida a partir del cloruro del ácido y la amina en medio básico (Esquema B).

El cloruro del 2,4 D (IV), se obtuvo dejando a reflujo el ácido con un exceso de cloruro de tionilo. El producto se purificó destilando a presión reducida, recogién dose la fracción que destiló a 150°C-3 mm de mercurio. El producto puro presenta en su espectro I.R. la banda característica de -C(=O)-Cl a 1795 cm^{-1} .

Como ya se mencionó anteriormente, el 2,4-diclorofenoxiacetamido- ϵ -L-lisina se preparó empleando la reacción de Schotten-Baumann. En esta preparación se hicieron las siguientes observaciones: el contacto entre el cloruro del ácido y el complejo lisina-cobre se favorece y se añade una pequeña cantidad de éter etílico (tal como Kurtz describe para la preparación de p-nitrobenzoil- ϵ -lisina), también se encontró que la formación del complejo 2,4

D-lisina-cobre se favorecía si la cantidad de agua en que se disolvía el complejo lisina-cobre no era muy grande (aproximadamente 40 ml. de agua por 2 g. del complejo). Como ya se dijo antes el complejo lisina-cobre tiene libre el grupo ϵ -amino que es el que reacciona para dar la amida.

El complejo 2,4 D-lisina-cobre se destruye haciendo pasar -- una corriente de ácido sulfhídrico al compuesto suspendido en solución acuosa en medio ácido. El sulfuro de cobre formado se puede remover fácilmente debido a su baja solubilidad. El rendimiento relativamente bajo que se obtuvo, aproximadamente 31%, se puede explicar si se considera que parte del cloruro del ácido se hidroliza regenerando el ácido respectivo. El espectro I.R. del producto purificado por recristalización presenta las bandas características de amida secundaria una banda fuerte en 1660 cm^{-1} y una banda de intensidad media en 1540 cm^{-1} .

El espectro de R.M.N. del producto muestra las siguientes señales: en 1.2 ppm aparece una señal ancha que integra para cuatro protones y que corresponde a los metilenos de los carbonos 4 y 5 de la lisina, centrada en 1.65 ppm aparece una señal ancha que integra para dos protones y en 2.95 aparece otra señal ancha que integra también para dos protones, correspondiendo cada señal respectivamente a los metilenos de los carbonos 3 y 6 del aminoácido. En 3.8 ppm aparece un triplete que integra para un protón y que corresponde al carbono α del aminoácido y en 4.2 ppm aparece el singulete con integración para dos protones correspondiente al metileno del ácido. En la región de 6.5-7 ppm aparece los --

los hidrógenos aromáticos en señales que integran para tres protones. Con estos datos se comprueba la estructura del compuesto.

El 2-metil-4-clorofenol (V) se obtuvo haciendo reaccionar el o-cresol con cloruro de sulfurilo. El producto se purificó por destilación a presión reducida, comprobando su autenticidad por medio de sus constantes físicas y análisis de I.R. Este espectro presenta una banda ancha e intensa de O-H fenólico en 3270 cm^{-1} una banda intensa de C-O fenólico en 1200 cm^{-1} . Además se encuentran las bandas de núcleo fenilo; dos débiles en $1630, 1590\text{ cm}^{-1}$, una intensa en 1495 cm^{-1} y el patrón de fenilo 1,2,4 trisustituido en 800 y 870 cm^{-1} .

El ácido α bromo propiónico (VI) se obtuvo por bromación del ácido propiónico empleando como catalizador tricloruro de fósforo. La purificación del producto se realizó mediante destilación a presión reducida, recogiendo la fracción que destiló a $84-88^\circ\text{C}$ y 3.5 mm de Hg. El producto de esta reacción está constituido por la mezcla racémica. Su espectro de I.R. muestra en 3000 cm^{-1} una banda muy ancha que corresponde al ácido, en 1720 cm^{-1} se encuentra una banda intensa de carbonilo, en 1470 y 1390 cm^{-1} se encuentran dos bandas de intensidad media y débil que corresponden al grupo metilo.

En la obtención del ácido 2 (2-metil-4-cloro fenoxi) propiónico (MCP), (VII), se obtuvo la mezcla racémica. El punto de fusión del producto recristalizado fue de $93-94^\circ\text{C}$. El espectro de I.R. de este producto muestra la banda ancha de ácido en 2950 cm^{-1} también presenta una banda muy intensa de carbonilo en 1715 cm^{-1}

y el patrón de sustitución 1,2,4 en el anillo, bandas en 795 y 880 cm^{-1} . El espectro de R.M.N. muestra un doblete en 1.65 ppm que integra para tres protones y que corresponde al metilo del ácido, en 2.2 ppm aparece un singulete con integración para tres protones y que corresponde al metilo aromático.

La señal para el CH del ácido aparece como un cuadruplete que integra para un protón en 4.75 ppm y en la zona de 6.4-7.2 ppm aparece una señal compleja con integración para tres protones que corresponde a los protones aromáticos.

Para la preparación del cloruro del ácido MCPP (MCPP-Cl) (VIII), se siguió la misma técnica que se utilizó en la obtención del cloruro de 2,4 D; en este caso se recogió la fracción que destiló a 93°C a un ml de Hg. El análisis I.R. de este producto muestra una banda intensa en 1785 cm^{-1} que corresponde a -C-Cl.

"
O

La obtención del derivado MCPP-lisina se hizo de manera análoga a la de 2,4 D-lisina, sin embargo se observó que la reacción del MCPP-Cl con el complejo lisina-cobre fue más lenta y se requirió más tiempo para que el complejo MCPP-lisina-cobre precipitara, por lo que se aumentó el tiempo de reacción a aproximadamente cuatro horas o hasta que no se formara más precipitado. Al igual que en el caso del producto 2,4 D-lisina, se encontró que el volumen de agua en que se disolvía el complejo lisina-cobre es muy importante, ya que si este es muy grande puede suceder que el complejo MCPP-lisina-cobre no precipite. Des

pues de eliminar el cobre como sulfuro, se obtuvo el producto - MCPP-lisina que esta constituido por la mezcla de diastereoisóme- ros. Inicialmente se trató de separar estos isómeros por cromatografía en capa fina. Con esto se trataba de comprobar que solo un isómero es activo y se esperaba que únicamente este "reconociera" al receptor. Sin embargo, los intentos para separar - estos isómeros fueron infructuosos, por lo que se decidió usar la mezcla de diastereoisómeros, ya que el objetivo propuesto es aislar los receptores auxínicos y para ello no es necesaria la - separación. El espectro I.R. de la mezcla de isómeros presenta las bandas de amida secundaria, una de intensidad alta en 1660 cm^{-1} y otra de intensidad media en 1540 cm^{-1} . También se pudieron detectar la banda de ácidos en 1740 cm^{-1} , la banda de C-H en 2910 cm^{-1} y las bandas de Ar-H en 3060 cm^{-1} y el patrón de trisustitución 1,2,4 en 805 y 870 cm^{-1} . El espectro de R.M.N. resultó difícil de interpretar, debido a que la multiplicidad de - las señales no es muy clara, pues existen protones sobrepuestos, pero el espectro indica que se obtuvo el producto pues existen - protones aromáticos además de los de la lisina.

El bromuro de cianógeno (X) se preparó de acuerdo a la técnica descrita por Hartman y Dreger (38), haciendo reaccionar cianuro de sodio con bromo. Este producto es muy volátil a temperatura ambiente y sus vapores son muy irritantes y venenosos. El bromuro de cianógeno impuro se descompone rápidamente y tiende a explotar por lo que se recomienda prepararse poco antes de usarse. En este caso el producto se purificó por destilación, -

recogiéndose la fracción que destiló a 55°C (el punto de ebullición reportado es de 60-62°C a una atmósfera) y se guardó disuelto en acetonitrilo recién destilado (2 g por mililitro de disolvente).

El siguiente paso fue la activación de la sefarosa. Como ya se mencionó anteriormente, esta reacción involucra la adición del bromuro de cianógeno a una suspensión acuosa de la sefarosa en agitación. Se ha observado que la reacción es óptima a pH alcalino, pero la misma reacción genera iones H^+ . Uno de los métodos empleados para mantener el pH básico, ha sido la titulación manual de la reacción con la ayuda de un pHmetro, sin embargo es difícil controlar las variaciones de pH. Además la adición directa del bromuro de cianógeno es peligrosa por sus propiedades tóxicas e introduce una nueva variable en el proceso que es su velocidad de disolución. El método descrito por March, Parikh y Cuatrecasas (33), que fue el que siguió en el presente trabajo, supera estas dificultades ya que hace uso de un buffer para controlar el pH y añade el bromuro de cianógeno disuelto en un disolvente inerte miscible como es el acetonitrilo. Es importante hacer notar que la reacción de acoplamiento debe efectuarse con la mínima agitación posible para evitar la destrucción mecánica de la matriz. La siguiente reacción fue el acoplamiento con el ligando, la cual se efectuó de acuerdo con el método descrito por estos mismo autores. La capacidad de acoplamiento esta influida por la concentración inicial de carbonato, la temperatura y duración de la reacción de activación. El mayor porcentaje

de acoplamiento se obtuvo con una concentración de carbonato de sodio 2 M para la activación y se encontró que el rendimiento se incrementa si la temperatura de activación es de 4°C. El producto MCPP-lisina no es soluble en agua por lo que se disolvió primero en metanol antes de agregar a la solución acuosa del acoplamiento, a pesar de esto la mezcla de reacción quedó un poco turbia.

Los resultados obtenidos en los dos acoplamientos realizados se muestran a continuación.

Primer acoplamiento

(temperatura de acoplamiento aprox. 4°C)

Ligando	Mg	Sefarosa	Vol. final	Conc. teor.
2,4D-lis	17 mg	10 ml	100 ml	4.87×10^{-4} M
MCPP-lis	36 mg	10 ml	100 ml	1.05×10^{-3} M

Ligando	$A_{\text{teórica}}$	A_{Obtenida}	%Acoplamiento
2,4 D-lis	0.72	0.250	34.7%
MCPP-lis	2.04	0.265	13%

Conc. Teor.= La concentración de ligando en el volumen final si todo el ligando añadido se hubiese acoplado. Con este valor de concentración y el coeficiente de extinción molar calculado se obtiene la absorbancia teórica ($A_{\text{teórica}}$)

Segundo acoplamiento

(temperatura de acoplamiento 5-15°C)

Ligando	Mg	Sefarosa	Vol. final	Conc. teor.
2,4 D-lis	15.80	10 ml	50 ml	9.05 x 10 ⁻⁴ M
MCPP-lis	38.14	15 ml	100 ml	1.11 x 10 ⁻³ M

Ligando	A _{teórica}	A _{obtenida}	%Acoplamiento
2,4 D-lis	1.34	0.14	10.4%
MCPP-lis	2.16	0.17	7.9%

En ambos acoplamientos se empleó como disolvente de 2,4 D-lis agua, en tanto que para la determinación de-MCPP-lis acoplada se dejó sedimentar la sefarosa y se cambió el agua por metanol.

La determinación directa del % de acoplamiento presenta la dificultad de que la sefarosa tiende a sedimentar, por lo que se recomienda hacer las lecturas después de agitar la celda, tan rápido como sea posible. Los valores de absorbancia reportados anteriormente son el promedio de tres determinaciones.

Como se puede observar en los resultados del acoplamiento, el segundo experimento tuvo una baja en el rendimiento, esto se debe seguramente al aumento de la temperatura ocurrido por una falla en el control de ésta. Así mismo se puede observar en ambos acoplamientos que el ligando MCPP-lisina se acopló menos -- que la 2,4 D-lisina, esto puede deberse a que este compuesto es

poco soluble en agua y como ya se indicó tuvo que agregarse metanol, pero a pesar de esto no se logró una transparencia completa; lo cual hace pensar que parte del ligando no pudo reaccionar con la matriz.

Como ya se indicó estas columnas de cromatografía de afinidad se van a usar para el aislamiento de receptores auxínicos.

PARTE EXPERIMENTAL

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato de Fischer. Los espectros de absorción en el infrarrojo se determinaron en un espectrofotómetro Perkin Elmer modelo 337. Los espectros de resonancia magnética nuclear se determinaron en un espectrómetro analítico Varian A-60, utilizando cloroformo deuterado como disolvente del producto MCPPP-lisina y agua deuterada para el producto 2,4 D-lisina, el tetrametil silano se empleó como referencia interna; el desplazamiento químico está expresado en partes por millón (ppm), utilizando el parámetro δ . Los espectros de absorción en el ultravioleta fueron determinados en un espectrofotómetro Carl Zeiss modelo PMQ II. Las cromatografías en capa fina se efectuaron usando como adsorbente sílice GF-254 de Merck, utilizando como reveladores luz ultravioleta y yodo.

IV. PARTE EXPERIMENTAL

Síntesis del Complejo L-lisina-Cobre (I).

Se siguió la técnica descrita (35), sustiyendo únicamente el sulfato de lisina por el clorhidrato correspondiente.

El clorhidrato de L-lisina (2.74×10^{-3} moles, 0.500 g) se disolvió en agua (aprox. 15 ml) y a la disolución en ebullición se le agregó gradualmente un exceso de carbonato de cobre (1.78×10^{-3} moles, 0.220 g., exceso de 30% aproximadamente). La mezcla de reacción se enfrió, se filtró el exceso de carbonato de cobre y se evaporó un poco de disolvente en el rotavapor. El complejo se recristalizó de etanol-agua con los resultados siguientes.

Rendimiento: 0.48 g, 99.2%.

Punto de fusión: 245-250°C con descomposición.

Características espectroscópicas I.R. $\bar{\nu}$ max (cm^{-1}): N-H 3400 (m-f); -NH_3^{\oplus} 3000 (m-f); C-H 2910 (m-f); N-H 1650 (f); -COO^{\ominus} 1580 (f), 1400 (m); C-H 1390 (m).

Síntesis del etil carbonato de 2,4-diclorofenoxiacetilo (II)

Se adaptó la técnica reportada en la preparación del indol-3-acetil- ϵ -L-lisina (AIA-lis), (34), como sigue:

Una solución de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4 D) (2.74×10^{-3} moles, 0.605 g) y trietilamina (2.74×10^{-3} moles, 0.279 g, 0.24 ml) en éter etílico (aprox. 15 ml), se llevó a 0°C y se añadió agitando vigorosamente el clorocarbonato de etilo (2.74×10^{-3} moles, 0.297 g, 0.26 ml). La agitación se continuó durante 10 minutos, se filtró y al filtrado se le evaporó el disolvente mediante un baño de agua. El producto (residuo aceitoso) así obtenido,

se descompone antes de destilar aún a presión reducida (aprox. 3 mm de Hg). Sus características espectroscópicas son las siguientes:

I.R. $\bar{\nu}$ máx (cm^{-1}): $\text{O}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{O}$ 1750 (f); Ar-H 3080 (d); 1,2,4 tri

sustituido 860, 800 (m).

R.M.N. Ar-H 6.8, 7.6 (m 3H); $-\text{O}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-$ 4.75 (s 2H); $-\text{O}-\text{CH}_2-$

Me 4.35 (c 3H); $-\text{CH}_3$ 1.4 (t 3H).

Intento de síntesis del etil carbonato de 2,4-diclorofenoxiacetilo (II).

Se hizo otro intento previ^o para sintetizar el etil carbonato de 2,4-diclorofenoxiacetilo, siguiendo la técnica ya descrita - pero usando dioxano como disolvente (tal como esta reportado), sin embargo no se observó reacción ya que a 0°C el dioxano es sólido por lo que se cambió por éter.

Intentos de síntesis de 2,4-diclorofenoxiacetamidolisina (2,4 D-lisina) (III).

Se siguió la técnica descrita (34); al etil carbonato de 2,4-diclorofenoxiacetilo disuelto en dioxano, se le agregó el complejo lisina-cobre disuelto en agua con hidróxido de sodio (en relación de 2:1:1 moles); la mezcla se agitó a temperatura ambiente - durante 20 minutos, se sulfhydró y se filtró. El filtrado se evaporó en el rotavapor y en el residuo se identificaron mediante espectroscopía las materias primas sin reaccionar.

A esta técnica se le hicieron varias modificaciones como: - tiempo de reacción (se probaron 30 minutos, 4 y 12 horas); disol-

vente (se cambió el dioxano por mezcla éter-agua 2:1 y agua, con tiempo de reacción de 30 minutos); temperatura (0°C y temperatura ambiente con los distintos disolventes y tiempo de reacción de 30 minutos) y en todos los casos se recuperaron las materias primas.

Síntesis del cloruro del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4 D-Cl) (IV).

Al ácido 2,4 D (2.26×10^{-2} moles 5.0 g) disuelto en benceno, se añadió cloruro de tionilo (4.52×10^{-2} moles, 5.38 g, 3.3 ml) y se dejó a reflujo durante aproximadamente 3 horas. El exceso de cloruro de tionilo y benceno se evaporó en el rotavapor y el residuo se destiló a presión reducida, dando así el cloruro del ácido.

Rendimiento 4.44 g, 82%.

Punto de ebullición: 150°C/3.5 mm de Hg.

I.R. $\bar{\nu}$ max (cm^{-1}): Ar-H 3070 (d); C-H 2900 (d); $\overset{\text{O}}{\parallel}\text{-C-Cl}$ 1795 (f); -C-O 1235 (m).

Síntesis de 2,4-diclorofenoxiacetamidolisina (2,4 D-lisina) (III).

El complejo lisina-cobre (5.69×10^{-3} moles, 2.01 g) disuelto en agua (aprox. 40 ml), se enfrió en baño de hielo a una temperatura de 10°C aproximadamente, se ajustó el pH entre 11 y 12 con una solución concentrada de hidróxido de sodio y se le añadió un poco de éter etílico (aprox. 10 ml).

A la mezcla anterior se agregó, en pequeñas porciones el -- cloruro del ácido 2,4 D (1.25×10^{-2} moles, 2.99 g, 10% de exceso) con agitación vigorosa y controlando el pH y la temperatura --

(tiempo de adición 30 minutos aprox.). La agitación se continuó durante 1-1.5 horas (hasta que no se observó formación de más precipitado).

El precipitado se filtró y lavó con agua fría hasta que el agua de los lavados no arrastró más complejo.

El complejo 2,4 D-lisina-cobre se suspendió en una solución de HCl 2 N (30 ml. aprox.), se calentó a 60°C y se descompusó haciendo pasar una corriente de ácido sulfhídrico. La mezcla se filtró y el filtrado se evaporó a sequedad en el rotavapor.

Rendimiento producto crudo: 1.95 g., 49.2%, punto de fusión -- 215-225°C. El producto se recristalizó de etanol-acetona.

Rendimiento: 1.23 g., 31%.

Punto de fusión: 241-43 °C.

I.R. $\bar{\nu}$ max. (cm^{-1}): N-H 3380 (m); COOH, NH₂ aprox. 2910 (m-f) -COOH 1745 (m-f); -C-NH 1660 (f); -C-H 1440 (m-f); 1,2,4 trisustituido, 845, 800 (m). O

R.M.N. : Ar-H 6.9-6.6 (m 3H); $-\text{O}-\boxed{\text{CH}_2}-\underset{\text{O}}{\text{C}}-$ 4.2 (s 2H); $\text{HN}-\boxed{\text{CH}_2}-\text{(CH}_2)_3$ 2.95 (s 2H); $-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$ 3.8 (t 1H); $-\boxed{\text{CH}_2}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$ 1.65 (2H); $-(\text{CH}_2)_2-$ 1.2 (m 4H).

Síntesis de 2-metil-4-cloro-fenol. (v) (39).

Al o-cresol (1.39 moles, 150 g.) colocado en un matraz de dos bocas, equipado con un refrigerante y un embudo de adición, se añadieron lentamente cloruro de sulfurilo (1.39 moles, 187.7 g, 112.6 ml). El matraz de reacción se colocó en un baño de agua helada para controlar la temperatura de la reacción, ya que ésta es muy exotérmica. La mezcla de reacción se destiló a presión reducida para

obtener el producto puro. (NOTA: El refrigerante se conectó a con un tubo de salida, que va a un recipiente con H₂O para recibir los gases desprendidos, durante la reacción).

Punto de ebullición: 126°C/9 mm, de Hg.

I.R. $\bar{\nu}$ max.: O-H 3270 (m-f); C-O 1200 (m); 1,2,4 trisustituido 800, 870 (m); >C=C< 1500 (f).

Síntesis de ácido 2 bromopropiónico (VI) (40).

Al ácido propiónico (6.28×10^{-2} moles, 4.65 g., 4.7 ml) colocado en un matraz bola de 50 ml., equipado con un refrigerante y una trampa (fig. 8), se le agregó el bromo (6.83×10^{-2} moles, 10.9 g., 3.5 ml). El refrigerante se removió y se añadió lentamente tricloruro de fósforo (0.2 ml). La mezcla de reacción se calentó en baño de agua (a 65-70°C aprox.) con agitación durante cuatro horas (desprendiéndose ácido bromhídrico). La temperatura del baño se aumentó (80°C aprox.) y se continuó hasta desaparición del color del bromo (aprox. siete horas). La mezcla se destiló con vacío del laboratorio empleando una trampa de hidróxido de sodio, para atrapar el ácido bromhídrico desprendido. Posteriormente se destiló el residuo a presión reducida para obtener el producto.

Rendimiento: 7.4 g., 77%.

Punto de ebullición: 84-88°C/3.5 mm. de Hg.

I.R. $\bar{\nu}$ max.: -COOH 3000 (m); -C=O 1720 (f); -CH₃ 1470 (m), 1390 (d-m); -OH 1420 (m-d); -C-O 1240 (d); C-Br 645 (d).

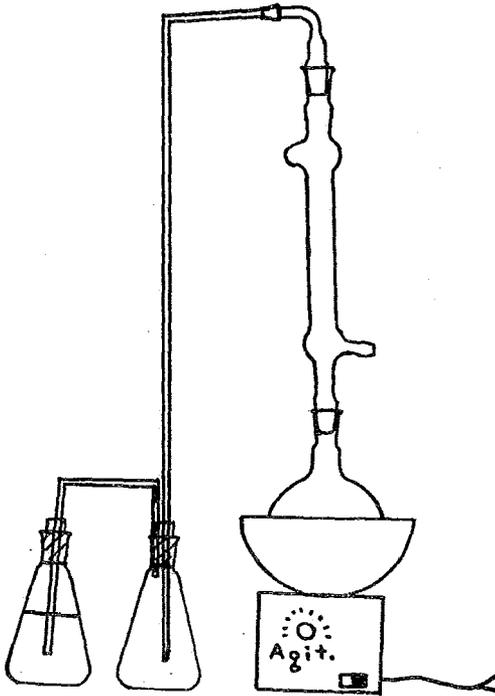


Figura 8.

Síntesis del ácido 2(2-metil-4-cloro fenoxi) propiónico
(MCP) (VII) (41).

El 2 metil 4 clorofenol (0.164 moles, 23.3 g) se añadió a una disolución de sosa (0.23 moles, 9.2 g en 10 ml. de agua). El ácido 2 bromopropiónico (0.065 moles, 10g) se agregó a la mezcla anterior y se dejó a reflujo durante 15 horas. El producto se acidificó y se extrajo con solución de bicarbonato de sodio al 5% (para extraer exclusivamente el ácido). La fase acuosa conteniendo el producto se neutralizó (aparece turbidez), y se extrajo nuevamente con acetato de etilo. El disolvente se evaporó y el producto se recrystalizó de acetona-hexano. Se obtuvieron 10 g. de producto con punto de fusión 93-94°C que corresponde a un rendimiento de 71.4%. Las características espectroscópicas del producto son:

I.R. $\bar{\nu}$ max.: -OH= 2950 (m); $\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}$ - 1715 (f); ν -CO 1235 (m);

>C=C< 1500 (m-f); 1,2,4 trisustituido 795; 880 (d).

R.M.N.: CH_3 1.65 (d 3H); Ar- CH_3 2.2(s 3H); C-H 4.75 (s 1H); Ar-H 6.4-7.2 (m 3H).

Síntesis del cloruro del ácido 2(2-metil-4-clorofenoxi) propiónico (MCP-Cl) (VIII).

Se siguió la técnica utilizada para preparar 2,4 D-Cl, (IV) con las siguientes cantidades de reactivos: ácido 2(2-metil-4-clorofenoxi) propiónico (1.40×10^{-2} moles, 3.0 g.) y cloruro de tionilo (2.80 moles, 3.33 g. 2 ml).

Rendimiento: 2.51 g., 77%.

Punto de ebullición: 93°C/1 mm. de Hg.

I.R. $\bar{\nu}$ max.: Ar-H 2995 (d); C-H 2970 (d); $\overset{\text{O}}{\parallel}$ -C-Cl 1785 (f);

-CO 1240 (f).

Síntesis de 2(2-metil-4-clorofenoxi) propionamidolisina (MCPP-lisina) (IX).

Se empleó la técnica para 2,4 D-lisina (III) utilizando: lisina-cobre (6.03 X10⁻³ moles, 2.134 g) y MCPP-Cl (1.43 x 10⁻² moles, 3.34 g, exceso de 18.9%). El tiempo de reacción se aumentó a 4 hrs. El producto de apariencia aceitosa se obtuvo con un rendimiento de 3.0 g., 72.6%. Para purificar el producto (mezcla de diastereoisómeros), se realizó cromatografía en capa fina, empleando como eluyente una mezcla de cloroformo-acetato de etilo 90:10 y corriendo la placa varias veces (4-5); a pesar de lo cual no se lograron separar los estereoisómeros y se decidió emplear la mezcla.

En el producto crudo se identificaron MCPP, clorhidrato de L-lisina.

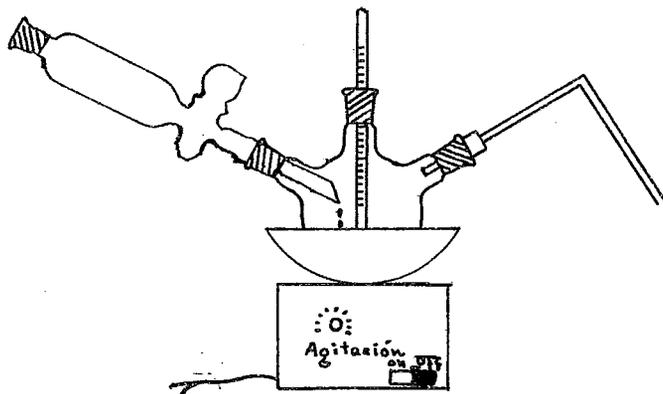
Recuperación de la purificación: 400 mg., 13.3%.

I.R. $\bar{\nu}$ max.: N-H 3300 cm⁻¹ (m); -COOH 1740 (m-f); $\overset{\text{O}}{\parallel}$ -C-NH 1660

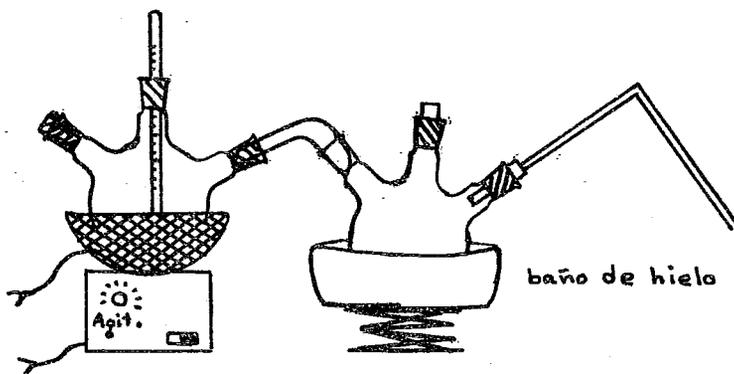
(f), 1540 (m); 1,2,4 trisustituido 805, 870 (m).

Síntesis de Bromuro de cianógeno (X) (38).

Un matraz bola de 250 ml. con tres bocas, colocado en un baño de agua con hielo, provisto de un agitador, un embudo de adición y un tubo de salida, se colocó en una campana.



Obtención del Bromuro de Cianógeno.



Purificación del Bromuro de Cianógeno.

Figura 9

Al matraz de reacción se le añadió el bromo (0.156 moles, 25 g. 8 ml) y agua (5 ml), esta última se agrega con el fin de disminuir la volatilidad del bromo. A la mezcla anterior, con agitación, se añadió gradualmente, mediante el embudo de adición, una solución de cianuro de sodio (0.163 moles, 8 g, en 60 ml de agua). La temperatura se mantuvo por debajo de 30°C durante el tiempo de adición.

Cuando la reacción se hubo completado (desaparición del color del bromo, alrededor de dos horas), se destiló el bromuro de cianógeno directamente en otro matraz, en este paso se debe vigilar que el producto no obstruya el tubo que une los matraces. El destilado se calentó con cloruro de calcio anhidro (cinco gramos) y se redestiló en un aparato semejante al anterior, recibiendo el producto (sólido blanco), en un matraz previamente tarado (Fig.9)

El producto se disolvió en acetonitrilo recién destilado (disolución de 2 g de bromuro de cianógeno por 1 mililitro de acetonitrilo) recién destilado y se guardó en el congelador). El producto se descompone y puede ser explosivo si se guarda en condiciones de inestabilidad por lo que es preferible prepararlo antes de usarse.

Rendimiento: 14.54 g., 87.8%.

Punto de ebullición: Se recogió la fracción que destiló a 55°C (punto de ebullición reportado 60-62°C/760 mm. de Hg.

Reacción de activación de la sefarosa.

Se siguió la técnica descrita por March, Parikh y Cuatrecasas (33) como sigue:

Se emplearon 10 ml de sefarosa 4-B para cada ligando (2,4 D-lisina y MCPP-lisina).

1) La sefarosa (10 ml) se coloca en un embudo buchner de fibra de vidrio (perfectamente limpio) y se lava con agua destilada (aprox. 1 litro). Se debe lavar un poco más de sefarosa para - - usarla como control en la determinación del % de acoplamiento.

2) A 10 ml. de sefarosa lavada se le agregan 200 ml de agua destilada y 20 ml de solución de carbonato de sodio 2 M.

3) A la mezcla anterior se agrega 1 ml de solución de bromuro de cianógeno en acetonitrilo (2 g/ml), agitando vigorosamente durante dos minutos (si el bromuro de cianógeno precipita se debe agregar más agua y continuar la agitación hasta asegurarse que no quede bromuro de cianógeno precipitado).

4) Transcurrido el tiempo de activación, se detiene la agitación y se filtra la sefarosa en buchner de vidrio poroso perfectamente limpio, lavándose con agua fría (este paso debe hacerse con rapidez).

5) La sefarosa activada se lava con las siguientes soluciones en frío:

- a) Bicarbonato de sodio 0.1M pH=9.5 (100 ml).
- b) Agua destilada (aprox. 1/2 litro).
- c) Bicarbonato de sodio 0.2^{*} M pH=9.5 (100 ml).

Estos lavados se deben realizar sin dejar que la sefarosa se empaquete.

6) Por último, se empaqueta la sefarosa y se resuspende en -

agua destilada (para añadir al ligando previamente preparado como se indica a continuación).

Reacción de Acoplamiento.

Se adaptó la técnica descrita por March, Parikh y Cuatrecasas (33), como sigue:

1) El compuesto se disuelve en aproximadamente 1.5 litros de agua (en el caso de MCPP-lisina, que no es soluble en agua, se disolvió en metanol aprox. 30 ml y se agregó agua hasta 1.5 litros), se agregan 10 ml. de bicarbonato de sodio 0.2 M pH=9.5 y se ajusta el pH entre 9.5 y 10.

2) La suspensión de sefarosa se agrega a la solución del compuesto por acoplar y se deja agitando muy lentamente durante 20 - horas a 4°C.

3) La sefarosa acoplada se filtra y se lava con las siguientes soluciones (agitando en cada lavado y cuidando que no se empaquete):

a) Acetato de sodio 0.1M pH=4 con NaCl 0.5M (100 ml).

b) Urea 2M más NaCl 0.5M (100 ml).

c) Bicarbonato de sodio 0.1M pH=10 con NaCl 0.5M (100 ml).

4) La sefarosa se lava con agua, se empaqueta, se resuspende en agua y se guarda en un recipiente sellado en el refrigerador.

Determinación del % de acoplamiento.

El rendimiento del acoplamiento se obtuvo por análisis ultravioleta para ambos ligandos (2,4 D-lisina y MCPP-lisina).

Se determinaron los espectros de absorción de estos compuestos en la región ultravioleta (190-360 nm). Los resultados fueron

los siguientes:

λ máxima 2,4 D-lisina= 281 nm. (disolvente agua)

λ máxima MCPP-lisina= 280 nm. (disolvente metanol).

Se construyó una curva patrón para cada producto en las longitudes de onda indicadas. Los datos obtenidos se dan a continuación:

2,4 D-lisina λ max.= 281 nm. (disolvente agua)

Mg. 2,4 D-lisina	Concentración moles/litro (x)	A (y)
5.30	$1.52 \times 10^{-4} \text{M}$	0.266
9.73	$2.79 \times 10^{-4} \text{M}$	0.354
15.26	$4.37 \times 10^{-4} \text{M}$	0.651
22.75	$6.52 \times 10^{-4} \text{M}$	0.978

El coeficiente de extinción molar tiene el valor de la pendiente de la recta que se obtiene al trazar la absorbancia (y) en función de la concentración molar del compuesto (x). Esta recta se ajustó mediante una regresión lineal por mínimos cuadrados, incluyendo el punto (0.0). La pendiente obtenida por este método es:

$$\epsilon \text{ molar} = 1481.3 \text{ litros/mol} \times \text{cm.}$$

El coeficiente de correlación lineal para los datos anteriores es:

$$r = 0.995$$

MCP- lisina	λ max.= 280 nm	(disolvente metanol)
Mg. MCP- lisina	Concentración moles/litro (x)	Absorbancia (y)
5.10	$1.49 \times 10^{-4} M$	0.390
12,25	$3.57 \times 10^{-4} M$	0.818
14.00	$4.08 \times 10^{-4} M$	0.880
16.00	$4.67 \times 10^{-4} M$	0.992
22.40	$6.53 \times 10^{-4} M$	1.270

Ajustando por mínimos cuadrados al igual que en el caso anterior, se tiene:

$$\epsilon \text{ molar} = 1944.4 \text{ litros/mol} \times \text{cm.}$$

El coeficiente de correlación lineal para estos datos es:

$$r = 0.993$$

Para conocer cuanto se acopló a la sefarosa, se mide la absorbancia de alícuotas de la sefarosa acoplada y se lee contra un control de sefarosa. Para verificar que tanto en la alícuota como en el control, se tiene la misma cantidad de sefarosa, se igualan los valores de absorbancia, de ambas muestras en λ max= 540 nm. en que se lee la turbidencia de la sefarosa. Posteriormente en la longitud de onda máxima correspondiente, se ajustó a cero de absorbancia con el control de sefarosa y se leyó la absorbancia del problema. Para estas determinaciones se empleó en el caso de 2,4 D-lisina, agua como disolvente, mientras que para MCP- lisina se utilizó metanol. Se calculó la absorbancia teórica si todo el ligando se hubiera acoplado y por comparación con la absorbancia obtenida se obtuvo el % de acoplamiento.

Los rendimientos se dan a continuación;

Primer acoplamiento (temperatura 4°C):

2,4 D-lis. 34.7%

MCPP-lis. 13%

Segundo acoplamiento (temperatura 5-15°C)

2,4 D-lisina. 10.4%

MCPP-lisina 7.9%

RESUMEN Y CONCLUSIONES

V. RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se hizo una revisión de los modelos que relacionan la estructura con la actividad auxínica, así como de los estudios realizados para aislar los receptores auxínicos.

Se sintetizaron 2,4 D-lisina y MCPP-lisina para utilizarlos como ligandos en cromatografía de afinidad.

Los ligandos se acoplaron a sefarosa usando bromuro de cianógeno como activador de la matriz.

El rendimiento del acoplamiento se determinó directamente en la sefarosa por espectroscopía en el ultravioleta con los siguientes resultados:

Primer acoplamiento (temperatura 4°C)

2,4 D-lis. 34.7%

MCPP-lis. 13%

Segundo acoplamiento (temperatura 5-15°C)

2,4 D-lisina 10.4%

MCPP-lisina 7.9%

La adaptación al método descrito por Kurtz (36, 37) permitió la obtención de los ligandos 2,4 D-lisina y MCPP-lisina. Estos compuestos se caracterizaron por espectroscopía en I.R. y R.M.N.; es necesario comprobar la obtención de los compuestos esperados debido a la importancia que el ligando tiene en la técnica de la cromatografía de afinidad.

El rendimiento de acoplamiento de 2,4 D-lisina con sefarosa

a temperatura de 4°C fue de 34,7% del mismo orden de magnitud que el valor reportado que es entre 30 y 40%. El rendimiento en el acoplamiento de este ligando a temperatura de 5-15°C disminuyó a 10.4% lo cual confirma que la temperatura es un factor muy importante para el acoplamiento.

Los bajos rendimientos de acoplamiento del ligando MCPP-lisina, 13% a 4°C y 7.9% a 5-15°C pueden deberse a que este producto no es soluble en agua siendo necesario agregar un poco de metanol ya que la reacción de acoplamiento se efectúa en medio acuoso; puede ser que la cantidad añadida de metanol no haya sido suficiente y sea necesario añadir un volumen mayor, aunque se debe cuidar que el pH de la solución no varíe demasiado.

La efectividad de estas columnas se probará en experimentos biológicos posteriores.

BIBLIOGRAFIA

VI. BIBLIOGRAFIA.

- (1) Weaver, R.J.
Reguladores del crecimiento de las plantas en la Agricultura.
Caps. 1, 3, 4 y 12.
Ed. Trillas
México (1976).
- (2) Smith, H. (ed)
The Molecular Biology of Cells Plants.
Botanical Monographs Vol. 14
Chap. 13 Hormone Action
University of California Press
California (1977).
- (3) Wilkins, M.B. (ed)
Physiology of Plant Growth & Development
Chap. 1 The Auxins by Thimann, K.V.
Mc. Graw Hill
London (1969).
- (4) Veldstra, H. The relation of chemical structure to biological activity un growth substances. Ann. Rev. Plant Physiol. 4, 151-198 (1953).
- (5) Smith, G. and Kennard, C.H.L. Structural and conformational - aspects of phenoxyalkanoic acids as determined in the solid state by diffraction methods. J. Agric. Food Chem. 27, 779-86 (1979).
- (6) Katekar, G.F. Auxins: On the nature of the receptor site and -

- molecular requirements for auxin activity. *Phytochemistry* 18, 223-233 (1979).
- (7) Porter, W.L. and Thimann, K.V. Molecular requirements for auxin action I. *Phytochemistry* 4, 229-243 (1965).
- (8) Farrimond, J.A., Elliot, M.C. and Clack, D.W. Charge separation as a component of the structural requirements for hormone - activity. *Nature*. 274, 401-402 (1978).
- (9) Jacobsen, J.V. Regulation of ribonucleic acid metabolism by plant hormones. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 28, 537-64 (1977).
- (10) Domínguez, J.L., Fernández, L.S., Gaunt, J.K., Sánchez de Jiménez, E. Control hormonal de la fisiología vegetal, las auxinas en el crecimiento de las plantas. *Rev. Soc. Quim. Mex.* 298-301 -- (1977).
- (11) Masuda, Y. Auxin-induced cell wall loosening. *Bot. Mag. Tokyo Special Issue* 1, 103-123 (1978).
- (12) Cleland, R.E. and Rayle, D.L. Auxin, H^+ -excretion and cell - elongation. *Bot. Mag. Tokyo Special Issue* 1, 125-139 (1978).
- (13) Venis, M.A. Stimulation of RNA transcription from pea and - corn DNA by protein retained on Sepharose coupled to 2,4-di - chlöröfenoxiacetic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 68, 1824- - 1827 (1971)
- (14) Venis, M.A. and Batt, S. Membrane-bound receptors for plant - hormones. *Biochemical Society Transactions* 3, 1148-1151 - (1975).
- (15) Ray, P.M., Dohrmann, U. and Hertel, R. Characterization of Naph - taleneacetic acid binding to receptor sites on cellular mem

- branes of maize coleoptile tissue. *Plant Physiol.* 59, 357-64 (1977).
- (16) Ray, P. M. Auxin-binding sites of maize coleoptiles are localized on membranes of the endoplasmic-reticulum. *Plant Physiol.* 59, 594-599 (1977).
- (17) Ray, P. M. Dohrmann, U. and Hertel, R. Specificity of Auxin-binding sites on maize coleoptile membranes as possible receptor sites for auxin action. *Plant Physiol.* 60, 585-91 (1977).
- (18) Cross, J. W. Briggs, W. R. Dohrmann, U. C. and Ray, P. M. Auxin receptors of maize coleoptile membranes do not have ATPase activity. *Plant Physiol.* 61, 581-84 (1978).
- (19) Dohrmann, U., Hertel, R. and Kowalik, H. Properties of auxin binding sites in different subcellular fractions from maize coleoptiles. *Planta* 140, 97-106 (1978).
- (20) Cross, J. W. and Briggs, W. R., Solubilized auxin-binding protein. *Planta* 146, 263-70 (1979).
- (21) Cross, J. W. and Briggs, W. R. Biochemical Characteristics of solubilized site I auxin-binding protein from zea mays. Annual report of the Director Department of Plant Biology, Carnegie Institution (1977-1978), 353-56.
- (22) Cross, J. W. and Briggs, W. R., Properties of a solubilized microsomal auxin-binding protein from coleoptiles and primary leaves of zea mays. *Plant Physiol.* 62, 152-57 (1978)
- (23) Murphy, G. The relevance of auxin binding to plant membrane fractions. *Pestic. Sci.* 9, 161 (1978).
- (24) Libbenga, K. R. Hormone receptors in plants. *Fronters of Plant Tissue Culture* 33 Hormone Receptors 325-33 (1978).

- (25) Bogers, R. J., Kulescha, Z. and Libbenga, K.R. The molecular action Mechanism of Auxins: Binding and metabolism of indole-3-acetic acid in the induction of the dedifferentiation in tobacco-pith explants. News Letter International Association for Plant Tissue Culture No. 28, 25-26 (1979).
- (26) Rizzo, P. J. Pedersen, K. and Cherry, J. H. Stimulation of transcription by a soluble factor isolated from soybean hypocotyl by 2,4-D affinity chromatography. Plant Science Letters 8, 205-11 (1977).
- (27) Sánchez de Jiménez, E. and Murillo, E. Mecoprop as a growth factor in wheat and rye tissue cultures. Canadian Journal of Botany , 57, 1479-83 (1979).
- (28) Sánchez de Jiménez, E., Albores, M, Loyola, V. M. Effects of 2,4 D analogs on maize tissue cultures. (en prensa- - Annals of Applied Botany 1980)
- (29) Sánchez de Jiménez, E., Albores, M., Aguilar, R. (comunicación personal)
- ∞ (30) Cuatrecasas, P. Wilchek, M. and Anfinsen, C. B. Selective enzyme purification by affinity chromatography. Biochemistry 61, 636-43 (1968)
- ∗ (31) Lowe, C.R. and Dean P.D.G.
Affinity Chromatography
John Wiley & Sons
(1974)
- ∗ (32) Jacoby, W. B. and Wilchek, M. (eds.) Methods in Enzymology Vol. XXXIV, Enzyme Purification Part B Parikh, I, March, S. and Cuatrecasas, P. Topics in the methodology of substi-

tution reactions with agarose

- (33) March, S. C., Parikh, I. and Cuatrecasas, P. A simplified Method for cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography. *Analytical Biochemistry*, 60, 149-52 (1974).
- (34) Hutzinger, O. and Kosuge, T. Microbial synthesis and degradation of indol-3-acetic acid III. The isolation and Characterization of indole-3-acetyl- ϵ -L-lysine. *Biochemistry* 7, 601-05 (1968)
- (35) Neuberger, A. and Sanger F. The availability of the acetyl derivatives of lysine for growth. *Biochem. J.* 37, 515-518 (1943).
- (36) Kurtz, A. C. A new method for isolating-L-(+)-lysine. *J. Biol. Chem.* 140, 705-10 (1941).
- (37) Kurtz, A. C. Use of cooper (II) ion in masking α -amino groups of amino acids. *J. Biol. Chem.* 180, 1253-1267 (1949).
- 8 (38) *Organic Synthesis* pag. 30 (1931), Vol. 11.
- (39) *Belstein Organische Chemie*.
- (40) Vogel, A. C. *Textbook of Practical Organic Chemistry* pag. 430. Longmans (1961)
- (41) Zynerholmand & Zimmerman, *Contrib. Boyce Thompson Inst.* (1945), 14, 91.