

00562.

1  
24

RECEIVED  
BIBLIOTECA  
UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
AUTONOMA  
DE MEXICO

**ESTUDIO DE LAS PROTEINAS CROMOSOMALES  
NO HISTONICAS EN TRIGO**

Tesis que para obtener el  
título de:

**MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS (Bioquímica) presenta:**

**EZEQUIEL MURILLO GARCIA**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

División de Estudios de Post-Grado  
Facultad de Ciencias Químicas  
U.N.A.M. (1980)



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

## INDICE

	pag.
I.- Introducción .....	1
Cromatina .....	1
Germinación .....	4
Cultivo de tejidos .....	7
Proteínas Cromosomales no histónicas .....	8
PCNH en plantas .....	13
Objetivos .....	15
II Materiales y Métodos .....	16
Embriones, plántulas y callosidades .....	16
Extracción de proteínas cromosomales no histó- nicas .....	19
Cromatografía en columnas de Sephadex G-100 y DEAE-Celulosa .....	23
Gradiente de Sacarosa .....	24
Análisis de aminoácidos .....	25
Determinación de fosfatos .....	26
Electroforesis en placas de acrilamida .....	27
III Resultados .....	31
IV Discusión .....	41
V Resumen .....	48
VI Bibliografía .....	51

Los mecanismos de diferenciación son uno de los aspectos más sobresalientes en el estudio de los organismos vivos, su estudio va hasta el origen mismo de los organismos pluricelulares y los mecanismos evolutivos que han impulsado la formación de estos mecanismos.

Dentro de una célula los mecanismos de diferenciación están en su origen en el núcleo, y más específicamente en el complejo de DNA y proteínas denominado cromatina; por esto ha sido de gran importancia el estudio de la estructura de la cromatina y de las proteínas asociadas a ésta.

Entre los procesos de diferenciación en plantas, la germinación ha sido quizá la más estudiada por ser este un buen modelo para su estudio. Por otra parte existen procesos de en los que una célula con función bien definida puede ser inducida hacia la formación de un tejido de características bioquímicas no diferenciadas denominado callo, esto es también un buen modelo para el estudio de los mecanismos de diferenciación.

Existen varias teorías para explicar los procesos de regulación de la expresión genética, las que intentan explicar la causa del origen de los procesos de diferenciación. Una de estas teorías está basada en la interacción del DNA con proteínas específicas.

## ANTECEDENTES

### Cromatina

El DNA de los organismos eucarióticos no se encuentra como moléculas desnudas en el núcleo, sino que está siempre con proteínas bá-

sicas (histonas) formando complejos de ducleoprotefnas llamadas nucleohistonas (1). Se piensa que las histonas funcionan para estabilizar las formas dúplex del DNA, para formar estructuras terciarias cromosomales, y para evitar la accesibilidad de enzimas al DNA. A través de estas características, las histonas producen un efecto general de represión de las posibilidades de expresión genética, y pueden ser un prerequisite para la evolución de los organismos pluricelulares. La actividad de ciertos genes específicos para cada tejido parece ser el resultado de la separación de ciertas histonas en sitios especiales del DNA. Así que de hecho el material genéticamente activo es la cromatina y no el DNA per se (2).

La importancia de las histonas se demuestra por su estabilidad evolutiva. En todos los animales y plantas se encuentran cinco fracciones mayores, al separarse electroforéticamente; además la secuencia de la mayor parte de ellas es similar entre diferentes especies. Las cinco fracciones en que se separan, se han dividido en dos grandes grupos dependiendo de su contenido en arginina y lisina.

La fracción denominada H1, tiene la mayor relación lisina/arginina, y se le denomina por ello fracción rica en lisina, estas histonas son las únicas que tienen cierta variabilidad de especie a especie. En las estructuras cromosomales denominadas nucleosomas, se les encuentra únicamente en las zonas que separan cada una de las subestructuras, así que no son indispensables para la estructura de superhélice que resulta en la formación de los nucleosomas; pero son de vital importancia para la formación de la estructura terciaria de la cromatina (4,5).

Las histonas denominadas H2a, y H2b contienen una relación de lisina/arginina de entre 1.0 y 2.5 por lo que se les denomina también

ricas en lisina. Estas histonas se encuentran en las subunidades cromosomales formando parte directa de los nucleosomas, aunque no son indispensables para la formación de la superhélice. Evolutivamente han cambiado poco y son una de las histonas mas facilmente fosforilables.

Las histonas H3 y H4 se les denomina ricas en arginina, ya que contienen una relación de lisina/arginina menor de uno, son indispensables para la formación de los nucleosomas, pueden incluso renaturalizarse los nucleosomas con solamente estas histonas. La conservación evolutiva de su secuencia de aminoácidos es realmente asombrosa, pues practicamente no han cambiado, esto es, las presiones evolutivas para conservarlas son enormes.

En los últimos años se ha estudiado intensivamente la estructura interna de la cromatina como resultado del descubrimiento de la existencia de subunidades que se forman al digerir suavemente la cromatina completa con DNasa estafilococal. Se les ha llegado a determinar ciertas características estructurales por una gran variedad de métodos (8).

Lo mas sobresaliente de estas subestructuras es el hecho de que son constantes en estructura y composición en toda la cromatina, y se ha encontrado que es general en todos los eucariotes estudiados.

El DNA en cada uno de los nucleosomas tiene configuración de superhélice que esta sostenida y estabilizada por medio de las histonas, sobre todo por las H3 y H4. Cada una de estas estructuras tiene un tamaño de 25  $\mu$  aproximadamente (5,6,7).

Entre cada una de estas estructuras se encuentra una región de DNA que es especialmente sensible a las DNAsas, y no forma parte de la estructura anterior, esta región esta cubierta sobre todo por histonas del

tipo H1. Los nucleosomas tienen además una gran cantidad de proteínas que no son indispensables para mantener la estructura de estas subunidades, pero son parte del sistema de represión y producción de RNA. Es aquí en donde figuran las proteínas cromosomales que no son histonas, y que son, en su mayor parte proteínas ácidas asociadas a las histonas por uniones iónicas (3).

Los procesos de diferenciación se han estudiado sobre todo al nivel morfológico, pero hay todavía una gran cantidad de interrogantes sobre los mecanismos moleculares en el núcleo que producen la diferenciación.

Una de las teorías se basa en la interacción entre las histonas y las proteínas ácidas de la cromatina; según esta teoría las histonas producen una represión general de la expresión genética, y son las proteínas ácidas las que permiten la expresión por la nulificación de la represión de las histonas por medio de la asociación con estas (10).

### Germinación

La aparición de la radícula a través de la cubierta de la semilla es considerado como germinación. Sin embargo este fenómeno está precedido por una gran cantidad de procesos moleculares que son parte de la germinación.

Cuando la semilla o el fruto es liberado de la planta, usualmente el embrión no está totalmente desarrollado, y necesita un período de secamiento antes de tener la capacidad de germinar (dormancia). Los procesos moleculares no se conocen, pero se sabe que la habilidad de germinar es paralela a la disminución en el contenido de agua.

Cuando la semilla está madura, solo las condiciones externas influyen en la germinación. El agua, es conditio sine qua non. La toma

de agua por las semillas secas empieza con el hinchamiento, que es un proceso puramente físico que involucra la hidratación de las macromoléculas contenidas en la semilla (carbohidratos, y proteínas principalmente).

La distinción entre el proceso físico y los procesos bioquímicos no están bien delineados, en algunas semillas por ejemplo la producción de RNA mensajero empieza a los 30 minutos después de haberse iniciado la entrada de agua (11).

La energía es necesaria para la germinación, se produce ATP por fosforilación en cadena respiratoria. Por esta razón la presencia de oxígeno es un requisito para la germinación.

La temperatura es un factor importante para la germinación, y usualmente refleja las condiciones en que se desarrolla la planta en su habitat normal.

Los mecanismos moleculares de la germinación después de que las condiciones externas se han logrado, han logrado, han sido estudiadas en algunas semillas. Se han descrito varios mecanismos, y se han encontrado algunas características generales en todos ellos.

Se piensa que uno de los fenómenos indispensables para desarrollar los procesos germinativos, es la síntesis de proteínas. Para llevar a cabo la síntesis de proteínas es necesario a su vez la presencia de polirribosomas, este es uno de los primeros fenómenos que se observa cuando se inicia la germinación (12). El RNA involucrado en los polirribosomas puede ser RNA sintetizado durante la maduración del embrión, o RNA sintetizado de novo, esto está apoyado por el hecho de que una de las primeras actividades encontradas en la germinación es el de la RNA polimerasa que existe ya en el embrión (13).



Hay algunas enzimas que se activan inmediatamente al entrar el agua, enzimas que ya están sintetizadas; estas enzimas varían de semilla a semilla dependiendo de las necesidades inmediatas (celulasa, amilasa, proteasa, lipasa etc), otras enzimas son el producto directo de la síntesis de proteínas, de RNA mensajero recién producido o preexistente (14).

La síntesis de DNA en el núcleo es un proceso que se lleva a cabo unas horas más tarde, para dar paso a la división celular. No se sabe en qué momento se lleva a cabo la síntesis de las proteínas cromosomales, aunque esta se lleva usualmente antes de la duplicación del DNA, especialmente las histonas.

Desde el punto de vista hormonal, el primer fenómeno que se observa, es la liberación de ácido giberélico hacia el tejido aleuronal, en donde probablemente hay receptores específicos. En la aleurona se induce la síntesis de un gran número de hidrolasas que movilizan materiales de reserva, se cree por otra parte, que, como resultado de la actividad de las nucleasas, se liberan las citoquininas que están contenidas químicamente en los ácidos nucleicos (ciertos RNA de transferencia), las proteasas liberadas producirían triptofano a partir del cual se sintetizaría el ácido indolacético, estimulando la elongación. El embrión así inducido crece y rompe la cubierta que ha sido parcialmente degradada por las pectinasas y celulasas producidas para lograr la elongación celular.

En orden de aparición, la radícula es más común encontrarla en primer lugar, y después el coleoptilo; esto es regla general en el caso de las monocotiledóneas como el trigo. Como resultado de la gravedad, el ácido indolacético emigra diferencialmente hacia cada uno de los órganos formados (radícula y coleoptilo), estos a su vez producen las reaccio-

nes geotrópicamente diferentes en cada órgano, debido a la diferencia en la sensibilidad del coleoptilo y la radícula. La radícula se dirige hacia abajo, en un geotropismo positivo, mientras que el coleoptilo se dirige hacia arriba en un geotropismo negativo.

Tan pronto como el coleoptilo está expuesto a la luz, diferenciará su aparato fotosintético completo, y la germinación se considera como terminada, para dar paso al estadio de desarrollo de la planta (15).

### Cultivo de tejidos

Para reconocer los factores que influyen en el desarrollo del embrión, se han usado principalmente medios artificiales que reemplazan los nutrientes que aporta el endospermo, sin embargo no solamente se han usado embriones, sino también otros órganos de la planta para lograr la diferenciación de un tejido hasta la formación de una planta completa.

En el caso del embrión, antes de la formación de la planta, se forman callosidades en la superficie del embrión, cuando este está cultivado en un medio que le proporcione una citoquinina y una auxina en concentraciones tales que inducen este fenómeno; esta callosidad puede entonces diferenciarse hacia la planta completa, cuando se le pone en el medio adecuado, pasando por un estadio que se parece al del embrión (53).

El tejido formado antes de la rediferenciación se ha reconocido como un tejido no diferenciado con posibilidades totipotenciales (53).

Los intentos para conservar las callosidades no se resolvieron hasta que no se reconoció la importancia de las fitohormonas sintéticas o naturales y las vitaminas en la promoción de la división celular y la conservación del estado no diferenciado (53).

La producción y conservación de callosidades vegetales se ha reconocido como un fenómeno que tiene gran importancia para el estudio de los mecanismos morfológicos, bioquímicos y moleculares de la diferenciación.

Desde el punto de vista morfológico se ha estudiado la regulación que tienen ciertas células, así como su posición relativa para la formación de tejidos diferenciados (embrión a partir de callo (54)). Desde el punto de vista bioquímico se ha estudiado la regulación de ciertos productos secundarios con vistas a la producción industrial de estos productos en condiciones reguladas (16). Sin embargo los mecanismos moleculares involucrados en la producción y mantenimiento de este tejido no ha tenido mucha atención.

Se han encontrado sin embargo problemas para la inducción y la conservación del tejido no diferenciado, una de las barreras ha sido la heterogeneidad de respuesta de diferentes especies y tejidos hacia las diferentes hormonas naturales y sintéticas, y sus contenidos relativos. Se ha encontrado que las hormonas y sus concentraciones no dependen solamente de la especie usada, sino del tejido usado para la producción de la callosidad. Usualmente se usa un balance entre una auxina y una citoquinina, la primera será la promotora del tejido no diferenciado, y la segunda estimulará la división celular del tejido en formación. Sin embargo el mecanismo de acción de ambas hormonas no es simple, y sus efectos son dependientes de las concentraciones respectivas, de tal manera que estos no son aditivos. Se han usado algunas otras hormonas como giberelina y ácido absísico, pero los resultados en algunos casos no han sido consistentes. (17).

#### Proteínas cromosomales no histónicas

Se ha sugerido que estas proteínas participan en la regulación

de la expresión genética, teniendo además funciones enzimáticas y estructurales en la cromatina.

Están definidas como aquellas proteínas que se aíslan de la cromatina o de los cromosomas, excluyendo a las histonas. Esta clase de proteínas probablemente se traslapa con las proteínas cromosomales ácidas, y las fosfoproteínas nucleares aunque no son idénticas. Los métodos de extracción de estas proteínas se basan principalmente en extracciones básicas o precipitaciones ácidas, y esto hace que muy frecuentemente se mencionen las proteínas cromosomales ácidas, y las proteínas cromosomales no histónicas como sinónimos. La extracción de estas proteínas no es fácil por su tendencia a agregarse unas con otras y con las histonas. Hay una gran cantidad de protocolos para la separación de estas proteínas, usualmente se obtiene la cromatina por el método de Huang y Bonner (18), que involucra la separación de la cromatina por centrifugación sobre un colchón de sacarosa 1.7 M, esta cromatina puede permanecer no suspendida, o suspendida por varios métodos. En el caso de mantenerse suspendida se produce la disociación de sus componentes (19).

Uno de los métodos más empleados para la obtención de las proteínas cromosomales no histónicas es la obtención de proteínas en solución de 1% SDS después de haber eliminado las histonas por medio de ácido mineral diluido. El método preferido para los experimentos de reconstitución de la cromatina se lleva a cabo por medio de la extracción de las proteínas con una solución de urea 5 M y Na Cl 2 M; eliminando el DNA por medio de la hidroxapatita, y las histonas por medio de una columna de intercambio iónico. Otros métodos involucran la extracción de las proteínas de la cromatina soluble con una solución de NaOH 0.2 M, o la precipitación

de las proteínas de la cromatina solubilizada por medio de HCl y  $H_2SO_4$  0.2 N.

El número de proteínas cromosomales no histónicas, y su heterogeneidad, las hacen especialmente diferentes de las histonas. En número se han separado de 20 a 115 en tejidos animales y alrededor de 16 a 20 en tejidos vegetales (20).

Sus características fisicoquímicas son especialmente contrastantes con las de las histonas. Las proteínas cromosomales no histónicas tienen usualmente una relación de aminoácidos básicos/ácidos de 1.2 a 1.6. Los pesos usualmente están entre 10 000 y más de 100 000 daltones, en el caso de polipéptidos individuales. Sus puntos isoeléctricos están entre 3.7 y 9. En el caso de las proteínas cromosomales no histónicas de timo de ternera y de algunos tejidos animales en cultivo, se han clasificado de acuerdo a algunas de sus características, sobre todo de peso molecular, punto isoeléctrico y composición de aminoácidos. Incluso se han aislado y purificado algunas de ellas, Una de estas, la denominada HMG<sub>17</sub> (high mobility group 17) se ha secuenciado completamente, y se han hecho ensayos de función, sin embargo en su interacción con el DNA no se ha observado especificidad (21).

A diferencia de las histonas, las proteínas cromosomales no histónicas tienen una gran especificidad de tejido, sobre todo entre aquellos tejidos que tienen una morfología muy diferente; se han estudiado ampliamente las diferencias y similitudes de las preparaciones de diversos tejidos de rata incluyendo tejidos en cultivo; se ha encontrado que existe una gran cantidad de diferencias entre los diferentes patrones electroforéticos de estos tejidos sobre todo entre tejidos con poca relación mor-

lógicas : tejido de cerebro, corazón o hígado contra suprarrenales (22).

Se ha investigado ampliamente el papel de estas proteínas en la derepresión de la síntesis del RNA. Por medio de cromatina reconstituida con proteínas cromosomales no histónicas de diferentes orígenes, se ha demostrado que juegan un papel muy importante en la especificidad de la cromatina para producir diferentes especies de RNA. Se ha demostrado que la acción de estas proteínas en la derepresión se lleva a cabo por su conjugación con las histonas que producen la represión (23,24,25).

Las proteínas cromosomales no histónicas se han estudiado también durante el ciclo celular, y se ha demostrado que la síntesis de algunas de ellas es concomitante a los cambios sufridos durante el ciclo celular (26). En otros casos se han estudiado los cambios sufridos durante el ciclo, en las fases  $G_0$  y  $G_1$  en células normales y células transformadas, y se ha sugerido que tienen un papel importante en los cambios estructurales y funcionales de la cromatina (27).

Otros datos apoyan la hipótesis de funciones específicas durante el ciclo celular. Mientras que las histonas no cambian en su relación cuantitativa con el DNA, las proteínas cromosomales no histónicas sufren amplios cambios durante el ciclo celular en cantidad con respecto al DNA y a las histonas (28).

La única modificación postranscripcional que se ha estudiado en estas proteínas es la fosforilación. Se ha podido determinar que hay cambios en los patrones electroforéticos por fosforilación en diferentes estadios de diferenciación en animales (29). Sin embargo no ha sido posible relacionar los cambios en fosforilación con cambios en la función de las proteínas, al menos su especificidad por el complejo cromosómico permanece inalterado (30).

La evidencia del papel regulatorio de estas proteínas es muy grande, sin embargo el mecanismo por el cual esta regulación se lleva a cabo está muy lejos de visualizarse porque no es el único medio de remover las histonas para promover la síntesis del RNA. Se ha demostrado que ciertas fracciones de RNA tienen la misma capacidad (31) y algunos cationes (32).

Por otra parte se ha querido determinar con precisión la distribución de las proteínas cromosomales no histónicas en la cromatina y se ha encontrado que de 80 a 100% de estas proteínas se encuentran en los sitios activos en la transcripción, mientras que solo un 5 a 10 % del DNA y de un 20 a 40 % de las histonas se encuentran en estos sitios (9). Se ha determinado por inmunofluorescencia que existen proteínas específicas que se encuentran en los "puffs" de los cromosomas politénicos de Drosophila, pero además estas proteínas se encuentran ya en los sitios que serán "puffs" desde el estadio larvario. Los "puffs" son regiones en las que existe una abundancia en la síntesis de RNA (33).

Se ha pensado también, que estas proteínas tienen un papel estructural, sin embargo hay mucho menos evidencia de esto, sobre todo, porque los métodos de extracción son tan drásticos que el estudio de interacciones después de su extracción y purificación ha sido muy difícil, sin embargo se ha determinado que las proteínas HMG 1 y HMG 2 (high mobility group 1 y 2) de timo de ternera, aumentan el  $T_m$  del DNA al que se asocian de  $4^{\circ}\text{C}$  a  $65^{\circ}\text{C}$ , se ha demostrado además por espectroscopía de dicroísmo circular que los complejos que forman no son al azar (34).

Por otra parte se ha determinado que las proteínas no histónicas están más relacionadas con los espacios entre los nucleosomas que con los nucleosomas mismos (8).

### Proteínas cromosomales no histónicas en plantas

Las proteínas cromosomales no histónicas en plantas han sido examinadas en varios sistemas, pero la información es muy limitada comparada con la existente en animales. Existen reportes en plántulas de frijol (35), poien en desarrollo (36), cultivo de tejidos de zanahoria (37), y plántulas de maíz (38), trigo (39) y haba (40), así como Lemna (41) y Spirillum (42).

La heterogeneidad de estas proteínas en diferentes tejidos ha sido en general poca, por ejemplo en diferentes tejidos de una plántula de maíz, las proteínas cromosomales no histónicas son idénticas en geles de acrilamida, usando varias técnicas de extracción y varias técnicas de geles de poliacrilamida (38), sin embargo en diferentes partes de hipocotilo de frijol se encuentran ligeras diferencias (35), lo mismo que en diferentes órganos de una plántula de haba (40) y trigo (39).

Reiner y Matsumoto han estudiado la cromatina de zanahoria en la transformación de callos en cultivo in vitro hacia la formación de embrión, encontraron solo pequeñas diferencias en patrones electroforéticos de las proteínas cromosomales no histónicas entre ambos tejidos. Sin embargo la velocidad de síntesis del RNA llevado a cabo con cromatina reconstituida con proteínas cromosomales no histónicas de los dos diferentes estadios de diferenciación, fué diferente, siendo mas elevada con proteínas cromosomales de embrión que de los callos (37). Yasuda y Sashaki encontraron no solamente diferentes velocidades de síntesis, sino que correlacionaron este cambio con la disminución de dos proteínas cromosomales no histónicas (43).

Hay poca información sobre fosforilación de las proteínas cro-



mosomales no histónicas en plantas. Van Loon y colaboradores (41) evaluaron la fosforilación in vitro e in vivo de las proteínas cromosomales en *Lemna* (chichicastle), y cebada; encontraron que la mayoría de las fosforilaciones se encuentran en las proteínas cromosomales no histónicas habiendo de 15 a 20 proteínas fosforiladas con un peso molecular de  $10^4$  a  $10^5$ ; el fósforo lo recuperaron como serina de fosfato. Encontraron además cambios en los patrones de fosforilación durante la germinación del centeno, pero los perfiles de las proteínas obtenidas de raíz y brotes fue muy similar (44), concluyen que los cambios durante la germinación pueden no ser el resultado de la diferenciación. Al igual que en animales (45), la fosforilación solo incluye al 0.1% de las proteínas aproximadamente, así que existe un aminoácido fosforilado por cada 100, lo que representa para una proteína de 40 000 daltones de peso molecular, 4 fósforos por molécula (44).

Se ha estudiado también el efecto de las auxinas sobre las proteínas cromosomales no histónicas. Se sabe que la auxina sintética 2,4-D, en plántulas de soya provoca un gran incremento en la síntesis de RNA en la región madura del hipocotilo (46), este incremento está dirigido sobre todo, hacia la producción del RNA ribosomal; se piensa que este aumento se debe a la mayor actividad de la RNA polimerasa I (47). El ácido indolacético por otro lado provoca el incremento de todas las especies de RNA aunque la RNA polimerasa II aumenta solo en un 30 % (46). Por ello se ha pensado que hay una modificación en las características en la cromatina. Efectivamente Yasuda y Yamada encontraron que el 2,4-D (2,4-Diclorofenoxiacetato) se une a la fracción histónica rica en lisina y provoca un cambio en sus características convirtiendola en proteína extraíble con soluciones básicas como las proteínas no histónicas. Murray y Key (48),

encontraron por otra parte, un aumento in vivo en la fosforilación de proteínas cromosomales de hipocotilo de soya despues de tratarlo con 2,4-D ; la mayor parte de la fosforilación se llevó a cabo en las proteínas cromosomales no histónicas; sin embargo, los perfiles electroforéticos no cambiaron. De aquí podría deducirse que la fosforilación en ciertas proteínas en momentos específicos juega un papel importante, mientras que los cambios cualitativos de las proteínas son de menor importancia.

Se ha descrito por otra parte, inhibidores de la transcripción en proteínas cromosomales no histónicas durante el ciclo celular en Spirogira (49), y en cotiledones de chícharo (Pisum sativum), en este caso el inhibidor se reconoció como una fosforilasa de UTP (50).

## OBJETIVOS

Este trabajo está dedicado al estudio de los cambios ocurridos en las proteínas cromosomales no histónicas en dos procesos que parten del mismo punto. La germinación y la producción de callosidades (tejido no diferenciado) son procesos que parten del mismo tejido (embrión), pero dependiendo de las condiciones externas (concentración de fitohormonas), se produce uno o el otro. Las diferencias morfológicas de ambos tejidos es muy grande, su bioquímica está poco estudiada, pero se sabe que es muy diferente en una gran cantidad de aspectos (55), y sobre todo funcionalmente son muy diferentes.

Los callos usados necesitan de una gran cantidad de nutrientes para ser generado y subsistir, y se sabe por ciertos estudios bioquímicos, que sus características son mas bien similares a los de raíz, por lo menos en lo que se refiere a su metabolismo nitrogenado (55).

La plántula tiene una gran cantidad de funciones que le son específicas, sobre todo la aparición y desarrollo de cloroplastos, por no hablar de su estructura anatómica; la raíz por otro lado tiene también una gran cantidad de funciones que le son propias, y su estructura anatómica es también específica de ese tejido diferenciado.

Las diferencias entre estos tejidos (embrión, callo y raíz), deben estar en última instancia en la expresión genética de la cromatina, por esto es muy importante el estudio de los factores que afectan esta expresión. Las proteínas cromosomales no histónicas son buenos candidatos para estar involucrados en este mecanismo, ya sea en sus cambios cualitativos per se o por modificaciones como la fosforilación.

## II MATERIALES Y METODOS

### Embriones, plántulas y callosidades

Las semillas usadas fueron Trigo (Triticum eastivum) de la variedad Potam S-70; ésta fué la fuente para el resto de los tejidos.

Los embriones se obtuvieron por el método del Dr. Stern, modificado por J. García (58). Este método consiste en la molienda de semillas completas en una licuadora Osterizer, usando 200 g de semillas, y moliendo durante 10 segundos a la velocidad máxima. Las semillas molidas se pasaron por tres mallas ( N° 8, 16 y 32); el material que permaneció en la malla de trama mas pequeña, se molió de nuevo, esto se repitió tres veces. El material de la malla de trama mas pequeña se usó como fuente de embriones. Usualmente se usaron de un kilo a kilo y medio de semillas para cada extracción de embriones . El material obtenido se virtió en un vaso que contenía aproximadamente medio litro de una solución de cloroformo-ciclohexano en proporción de 24 a 1 respectivamente.

El material que permanece flotando se recupera con una malla de metal, se seca sobre un embudo Büchner al vacío, y se limpia de material ligero soplando sobre el vaso de precipitados conteniendo el material. El producto obtenido esde un 30 a un 50 % embriones puros, el resto del material son gránulos de almidón en su mayoría. Este material se usó como fuente para la extracción de proteínas cromosomales no histónicas de embrión.

Los callos fueron obtenidos por dos medios. Uno de estos fué el cultivo de semillas completas en medio de Murashige y Skoog, como medio basal.

Las semillas se esterilizaron sumergiéndolas durante dos minutos en una solución de etanol al 70%, esto es principalmente para tra-

bajar las semillas con la tensión superficial baja, para producir una esterilización mas eficiente al poner a las semillas en contacto con una solución de hipoclorito de calcio al 10% durante 20 minutos (en realidad es una solución que se obtiene haciendo una mezcla de agua e hipoclorito de calcio al 10% vol/peso agitando durante cinco minutos y filtrando a través de papel filtro, el filtrado se usa como solución esterilizadora). Después de 20 minutos, se elimina el hipoclorito de calcio, y se lavan las semillas dos veces con agua estéril. Las semillas así obtenidas causan un 10% de contaminación después de 15 días de incubación en un medio de cultivo:

La siembra de las semillas se hizo habitualmente bajo una campana de flujo laminar, en tubos de dos y medio centímetros por diez cm, estos habfan sido llenados previamente con 8 mililitros de medio de inducción.

El medio de inducción fué el llamado Murashige y Skoog (M<sub>5</sub>), este medio contiene las siguientes sustancias:

			Para un litro de medio
Solución A	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.44 g	en 10 ml
Solución B	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.65 g	en 100 ml
	KNO <sub>3</sub>	1.9 g	
Solución C	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	25 g	
	KI	0.83 µg	en 10 ml
Solución D	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.17 g	
	H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	6.2 mg	
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.25 mg	en 10 mg
Solución E	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.37 g	
	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	17 mg	
	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	25 µg	en 10 ml

Solución F	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	57 mg	
	$\text{Na}_2\text{EDTA}$	74.5 mg	en 5 ml
Vitaminas	Piridoxina	500 $\mu\text{g}$	en 5 ml
	Tiamina	100 $\mu\text{g}$	en 5 ml
	Acido nicotínico	500 $\mu\text{g}$	en 5 ml
	m-inositol	100 mg	en 10 ml
	glicina	2 mg	en 2 ml
Fitohormonas	2,4-D	dos miligramos	en 10 ml
	cinetina	un miligramo	en 10 ml

La solución de 2,4-D se prepara llevando la solución a pH 7 la cinetina se disuelve en una solución ligeramente ácida (acidificando con HCl). El medio se prepara añadiendo los volúmenes que contienen cada uno de los nutrientes en la concentración indicada.

Se añaden al medio: la sacarosa (30 g por litro), y agar. que se disuelve por calentamiento (agar para hacer una solución. al 0.8%). Se vierten 8 ml del medio en cada tubo. Los tubos se tapan con papel aluminio y se esterilizan durante 15 minutos a 20 libras de presión.

El medio de inducción como puede apreciarse, contiene una concentración de fitohormonas de 2 partes por millón de 2,4-D y 0.1 partes por millón de cinetina.

Después de 21 días aproximadamente, de haberse iniciado la siembra se puede observar la formación de un callo proveniente del embrión el cual se resiembra, eliminando las partes diferenciadas en un medio M/S, pero esta vez conteniendo una parte por millón de 2,4-D y 0.05 partes por millón de cinetina. Estos callos fueron resembrados en un medio idéntico quince días después, el tejido obtenido se usó como fuente de proteínas cromosomales no histónicas.

En ocasiones se usó la siguiente combinación de fitohormonas en el mismo medio de Murashige y Skoog, esta produjo un crecimiento mas homogéneo de los callos. Para la inducción : 4 ppm de Mecoprop ((2,metil, 4 cloro) 2 fenoxi propionato), 2ppm de 2,4-D y 0.1 ppm de cinetina, para recultivar se usaron 2 ppm de Mecoprop, 1 ppm de 2,4-D y 0.1 ppm de cinetina.

Para los experimentos de inducción de callos a partir de embrión se utilizó simplemente un papel humedecido con una solución de 50 ppm de 2,4-D en condiciones estériles, y se colocaron las semillas estériles sobre él.

Con este método se logran tener pequeñas cantidades de callos a los seis días de incubación. Por este mismo método se pueden obtener tejidos intermedios entre embrión y la producción de callo, antes de que aparezca este. De la misma manera se obtuvieron los materiales para los estadios intermedios para la producción de plántulas a partir de la semilla completa, pero en este caso se usó el papel humedecido con agua estéril sin añadir ninguna fitohormona.

Todos los tejidos obtenidos por estos medios se congelaron inmediatamente despues de su obtención, para llevar a cabo la purificación de la cromatina.

#### Extracción de proteínas cromosomales no histónicas.

La purificación de la cromatina se llevó a cabo por el método de Huang y Bonner (53), modificado de la siguiente manera: el tejido se descongela y se congela tres veces, despues de lo cual se le agrega Policlar DT (polivinil pirrolidona, Sigma) al 10 % peso/peso, se continúa la homogeneización en mortero hasta obtener un pasta. Se agrega entonces

diez veces su peso, en medio de homogeneización, que consiste en Tris-HCl 0.05 M (pH 8),  $MgCl_2$  0.01 M, y mercaptoetanol 0.01 M. Se homogeneizó en un aparato Politrón (Politrón, Lucerna, Suiza), llevando a la velocidad máxima, durante dos minutos a 4<sup>o</sup> C. El homogeneizado se filtra por ocho capas de gasa y el residuo se resuspende en medio de homogeneización y se rehomogeneiza en el aparato Politrón. En el caso del callo esto se repitió una vez mas, y en el caso de la raíz se homogeneizó cinco veces en total. Después de esta homogeneización, el filtrado se pasó por una malla de nylon de 86 micras de poro, y con esto se eliminaron células que hayan pasado las capas de gasa.

El filtrado se centrifuga entonces a 4000 XG durante 30 minutos, el sedimento obtenido se resuspende en el mismo medio de homogeneización, se centrifuga una vez mas, esta vez a 10 000 XG durante 30 minutos. Esto se repite una vez mas. El residuo obtenido se resuspende en una solución de sacarosa 0.25 M, mercaptoetanol 0.01 M, se centrifuga entonces a 10 000 XG, esto se repite dos veces. Por último se resuspenden los residuos en una solución de Tris-HCl (pH 8), mercaptoetanol 0.01 M, y se centrifuga a 10 000 XG, este lavado se repite dos veces, con esto se obtiene cromatina cruda.

La cromatina cruda se resuspende en un pequeño volumen de Tris-HCl (pH 8) 0.05 M, mercaptoetanol 0.01 M, y se pone sobre una solución de sacarosa 1.7 M en un rotor de columpio del tipo SW 56 (Beckman, Palo Alto Cal.), y se centrifuga durante dos horas a 25 000 rpm.

Después de la centrifugación se elimina la solución de sacacosa y el residuo se considera como cromatina purificada. Esta cromatina está contaminada usualmente con almidón, en el caso del embrión, y conta-



minada con restos de pared celular en el caso de raíz y el callo.

La cromatina obtenida, se dializa contra una solución de Tris-HCl (pH 8) 0.01 M durante toda la noche. El contenido de la bolsa de diálisis se centrifuga a baja velocidad para recuperar la cromatina.

Esta cromatina se suspende en una solución de NaCl de 2 M, y se agita a 4°C durante 12 horas, o se homogeneiza en un homogeneizador Politrón a baja velocidad, recuperándose el sobrenadante como cromatina resuspendida. El residuo se resuspende en NaCl 2 M y se homogeneiza en homogeneizador politrón durante dos minutos sobre hielo. Se recupera de este modo un poco más de cromatina, una tercera homogeneización del residuo da una pequeña cantidad adicional.

La cromatina suspendida se trató entonces con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.2N (concentración final) y se dejó reposar por al menos seis horas a 4°C, después de este tiempo se centrifugó, y se recuperaron las proteínas ácidas en el residuo.

Las proteínas se resuspendieron en Tris-HCl (pH 9), 0.01M y el pH se ajustó con NaOH 0.01 M para llevarlo a pH 9, de esta manera las proteínas fueron totalmente solubilizadas. Esta solución se dializó durante toda la noche en contra del mismo amortiguador Tris-HCl (pH 8) 0.01 M en el cuarto frío.

Las proteínas dializadas se centrifugaron a 36 000 rpm en un rotor Spinco SW 56 (Beckman) a 25°C durante 18 horas, de esta manera el DNA contenido en la solución inicial se sedimenta. Después de esta centrifugación, se tomaron las dos terceras partes superiores de la preparación como proteínas libres de DNA. En ensayos posteriores se encontró que la cantidad de DNA en esta preparación está por debajo del 1% con respecto a las proteínas.

Las proteínas se determinaron por el método de Lowry y se liofilizaron. El método de Lowry (51) consiste en la adición de una

de cobre y una de fenol, a una muestra de proteínas, en este método se determinan las uniones peptídicas (reactivo de cobre) y los aminoácidos aromáticos (reactivo de fenol). El protocolo es como sigue: se prepara una solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2 % en una solución de NaOH al 1% estas dos soluciones se mezclan en proporciones iguales en volumen, obteniéndose así la mezcla de la solución de cobre. El reactivo de Folin (reactivo de fenol), se obtiene comercialmente (Merck); se diluye dos veces para ser usado en la determinación.

Para determinar concentraciones de proteínas, se usan 0.5 ml de la preparación de proteínas por determinar, se agregan 5 ml de la solución de cobre y tartrato, y se dejan correr 10 minutos, al cabo de estos, se agregan 0.5 ml de la solución de Folin, y se dejan correr 30 minutos, después de este tiempo se leen los tubos a 750 nm de absorbancia.

La curva patrón se prepara con soluciones de albúmina que tengan concentraciones que vayan de 25 a 250 microgramos por mililitro, rango en el que la relación de concentraciones y absorbancias se mantiene lineal.

La determinación de proteínas se hizo también por medio de la absorción de las proteínas a 280 nm en un espectrofotómetro (Zeiss) y se obtuvieron relaciones de absorbancia y concentraciones de proteínas. Este método fue de utilidad limitada porque muchas muestras tenían compuestos fenólicos en diferentes cantidades, que no hacía posible su comparación por absorción a 280 nm, longitud en la cual absorben fuertemente los fenólicos por sus características aromáticas.

### Cromatografía en columnas de DEAE-Celulosa

Se usaron columnas de DEAE-celulosa (Sigma) para la separación de los componentes de estas proteínas. La columna usada fue de un centímetro por 20 cm.

La DEAE-celulosa se reactivó suspendiéndola en una solución de NaOH y dejándola reposar durante 30 minutos, después de lo cual se lavó con agua hasta lograr la neutralidad. En seguida se lavó con una solución de HCl 1 M dejándola reposar unos 30 minutos, después de lo cual se lavó con agua hasta lograr la neutralidad. El producto se considera DEAE activado.

La columna se preparó vertiendo la suspensión de DEAE-celulosa hasta tener una columna empacada de 20 cm, en la parte superior se colocó un pedazo de papel filtro y se colocó la muestra de proteína. Usualmente en un volumen de uno a dos mililitros, existían de cinco a diez miligramos de proteína.

Se corrieron tres gradientes continuos, el primero de 0.01 Tris-HCl (pH 8), a 0.1 M de NaCl, en el mismo buffer, usando 20 mililitros de cada una de las soluciones, de tal modo que el volumen final de este gradiente fue de 40 mililitros.

El segundo gradiente se corrió de 0.1 M de NaCl a 0.4 M de NaCl, ambos en el mismo amortiguador de Tris, se usaron 20 mililitros de cada solución, así que el volumen de este gradiente fue de 40 mililitros.

El tercer gradiente fue de 0.4 de NaCl, usándose el mismo amortiguador Tris-HCl (pH 8), se usaron 20 ml de cada una de las soluciones, siendo la segunda solución de NaCl 1 M; el volumen final fue de 40 mililitros.

Se recogieron 120 fracciones de un mililitro cada una.

El flujo de la columna se mantuvo usualmente de 1.5 ml/min, por medio de una bomba peristáltica. La obtención de las fracciones se llevó a cabo por medio de un colector de fracciones LKB (Suecia), en los dos primeros gradientes se mantuvieron 18 gotas por fracción (aproximadamente un mililitro), el último gradiente necesitó 25 gotas por mililitro, ya que la mayor concentración de sal provoca que las gotas tengan un mayor volumen. Cada fracción se leyó en un espectrofotómetro Zeits a 289 nm.

#### Gradiente de Sacarosa

Se usó el método de Martin y Ames (52), aunque se hicieron algunas modificaciones. El método usado consiste en la centrifugación de una muestra de proteínas con una concentración aproximada de 1 mg/ml, usándose 0.2 ml para cada centrifugación.

Se usó un rotor SW 56 en una centrifuga Spinco (Beckman). El volumen total por tubo del gradiente fue de 3.65 ml. El gradiente esta formado por dos soluciones de sacarosa, de 20 % y de 5 % disueltas en una solución Tris-HCl 0.05 M (pH 8), el gradiente después de formarse se guarda durante al menos cuatro horas a 4°C.

Se corrió el gradiente de 8 a 12 horas, después de lo cual se colectaron 25 fracciones (tres gotas de cada una), por punción en el fondo, o por sifoneo por la parte superior, obteniéndose siempre las fracciones del fondo primero.

Cada una de las fracciones se leyó en un espectrofotómetro Zeits a 280 nm, para ser leídas las muestras se diluyeron tres veces con una solución de Tris-HCl (pH 8) 0.05 M. Se usaron como proteínas patrón: ribonucleasa, albúmina y tripsina en concentraciones de 1 mg/ml, y se usaron para la corrida un volumen de 0.2 ml en el que se encontraban las tres proteínas (conc. final 3 mg/ml).

### Análisis de aminoácidos

Para el análisis de aminoácidos se usó una hidrólisis ácida (56), el análisis se llevó a cabo en un autoanalizador por cromatografía; Labotrón Chromatocord.

Para la hidrólisis se usaron 10 mg de proteínas puras, estas se suspendieron en una ampollita que se selló al vacío. La ampollita se calentó entonces a 100°C durante 24 horas con agitación ocasional.

Después de la hidrólisis, el contenido de la ampollita se llevó a 5 ml, y el ácido clorhídrico se eliminó a baño maría, dejando los aminoácidos a sequedad. Estos se resuspendieron en 5 ml de agua, y la solución se filtró. Se eliminó el agua de nuevo a baño maría, y esto se repitió hasta que el pH de la solución fue neutro.

Los aminoácidos se resuspendieron en un amortiguador de citrato 0.2 M (pH 2.2), y se analizaron por cromatografía en un aparato Labotrón Chromatocord. Este aparato consiste en dos columnas intercambiadoras de iones, una para hacer la separación de los aminoácidos básicos y la otra para los aminoácidos ácidos, la muestra se hace pasar por las columnas a presión al vacío, el corrimiento dura así aproximadamente 6 horas. Los aminoácidos se identifican por su  $R_f$  y por su fluorescencia por su reacción con el isocianato. Para la comparación cuantitativa de los aminoácidos, se corren patrones con concentraciones conocidas.

La obtención de las concentraciones porcentuales de la muestra se hicieron con la ayuda de un integrador automático. Se tomaron en cuenta además las desaminaciones de la glutamina y la asparagina.

### Determinación de fosfatos

Las preparaciones de proteínas están contaminadas con pequeñas cantidades de DNA y RNA, por esto se eliminó primero el DNA presente por digestión con DNasa usándose diálisis al mismo tiempo, para eliminar los productos resultantes al mismo tiempo que la digestión se lleva a cabo. Se usó el método de Fiske y SubaRow para la determinación de los fosfatos (54).

Para la eliminación del DNA, 0.3 mg de proteína pura se disolvieron en 0.5 ml de amortiguador Tris 0.01 (pH 8.5). Se agregó 1 ml de DNasa que contenía 2.5 U de actividad (DNasa Sigma). Para obtener esta solución se tomaron 0.1 ml de una solución madre que contiene 25 U de actividad por mililitro.

La mezcla se dializó durante 18 horas a 32°C contra agua, de esta manera los nucleótidos formados por la acción de la DNasa se eliminaron al mismo tiempo que se formaban.

A la solución de proteínas libres de DNA se les añadió una gota de  $H_2SO_4$  concentrado fumante, y se evaporó a la flama hasta que el contenido se volvió café, se enfría el tubo en agua corriente, y se agrega una gota de ácido nítrico 2 N, y el calentamiento se continúa sobre la flama, cuando se desprenden vapores blancos se deja de calentar, se enfría al aire y se agrega 1 ml de agua y el tubo se pone en agua hirviendo durante cinco minutos.

Esta solución contiene fosfato libre que puede determinarse por el método de Fiske y SubaRow (54), este método consiste en lo siguiente: se determina la formación de molibdato de amonio, por medio de un reductor sensible a la concentración de fosfatos en medio ácido. Se utilizan

para este fin las siguientes soluciones: solución reductora, que contiene 0.2g de 1-amino-2naftol-4-sulfonato, 1.2 g de sulfito de sodio y 1.2g de bisulfito de sodio, esto se mezcla bien en un portero, y se toman 0.25 g y se disuelven en 10 ml de agua. El molibdato, es una solución de molibdato de amonio al 2.5 %. Se utiliza ácido sulfúrico 5 N. La solución estándar se prepara disolviendo 1.3613 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  puro en un litro de agua. Se usa diluyendo la solución 1:10, así que 1 ml corresponde a una micromol de fósforo.

La determinación se hace simplemente usando 8 ml de solución de hidrolizado de proteínas (esta preparación consiste usualmente en 1 ml de hidrolizado mas siete mililitros de agua), a la que se le añadió 1 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5 N, y 1 ml de la solución de molibdato, 0.1 ml de la solución reductora, y se lee la mezcla a 660 nm.

La curva patrón se hizo tomando 0.1 a 1 ml de la solución estándar de fosfatos y llevando estos volúmenes a 8 ml, de esta manera las concentraciones van de 0.1 a 1 micromol.

#### Electroforesis en placas de poliacrilamida

Para determinar los patrones electroforéticos se usó un método modificado del método originalmente descrito por Manzel (57).

Este método consiste en usar un aparato que es básicamente el mismo que para los geles en tubo, pero la corriente pasa a través de toda la placa de aproximadamente 30 x 30 cm, las muestras se ponen en los canales que deja un peine después de la polimerización de la acrilamida.

Se usaron las siguientes soluciones para la preparación de la placa: solución de acrilamida y bis acrilamida en proporción de

30:0.8, amortiguador Tris-HCl (pH 8.8) 1.5 M, Tris-HCl (pH 6.8) 0.05 M, SDS (dodecil sulfato de sodio) 10 %, TEMED (N'N'N, trimetil, etil-etilen diamina), y ácido persulfónico al 10 % (APS).

La placa se prepara de la siguiente manera : se unen las placas de vidrio con dos tiras de plástico a los dos lados, untadas con vaselina también, se fija por medio de dos mariposas a los lados, y se sella al fondo con una solución de agarosa al dos por ciento.

Las soluciones para formar el gradiente se preparan de la siguiente manera :

Solución	7 %	20 %
Acril/bis	2.33 ml	6.66ml
Tris 1.5 M (pH 8)	1.25 ml	1.25 ml
SDS 10%	100 microlitros	100 microlitros
Agua	6.266 ml	1.933 ml
APS 10 %	50 microlitros	50 microlitros
Volumen total	10 ml	10 ml

Después de agregar el APS, se agita la solución y se vierte cada una de las soluciones en un mezclador de gradientes, y se pasa la solución a la placa. Se deja unos 15 minutos. Después de lo cual se ha polimerizado la acrilamida.

La solución para la formación del gel espaciador es como sigue:

Solución	
Acril/bis	2.5 ml
Tris (pH 6.8) 0.5 M	1.875 ml



SDS 10 %	150 microlitros
TEMED	7.5 microlitros
Agua	10.325 ml
APS 10 %	150 microlitros
Volumen final	12 mililitros.

Esta solución se vierte en la placa en donde se ha colocado ya el peine que va a formar los canales en donde se pondrán las proteínas.

Después de unos 10 minutos, se retira el peine, se lavan los canales con agua y se secan con papel filtro.

En los compartimientos superior e inferior del aparato se vierte la solución de corrimiento, que contiene 3 g de Tris, 14.4 g de glicina, y 5 ml de una solución de SDS al 10 %, todo esto aforado a 1 litro, el pH final de esta solución es de siete.

Las proteínas se disuelven en Tris-HCl 0.01 M (pH 8), SDS 10 %, mercaptoetanol 10 %, y sacarosa 10 % peso/volumen, se ponen un minuto en agua hirviendo y se colocan de 20 a 100 microlitros de estas en cada uno de los canales. La concentración de proteínas en cada uno de los canales es de aproximadamente 1 mg/ml de tal manera que la cantidad total de proteína en cada uno de los canales es de 20 a 100 microgramos.

El corrimiento se llevó a cabo usualmente con una mayor corriente en el gel espaciador que en el gel de corrida, siendo la corriente de 5 a 15 mA (aproximadamente 20 a 100 V), el tiempo de corrida varió de 8 a 14 horas. Se usó corriente constante, dada por el aparato IESCO, usualmente el voltaje aumentó al ir pasando las proteínas de una concentración baja a una mas alta de acrilamida a lo largo de la placa.

Después del corrimiento, se separaron las placas de vidrio, y se sacó con cuidado la placa. Se tiñó la placa sumergiéndola en una solución de 0.062 % de azul de Coomasie en ácido tricloroacético 50 % p/v durante 20 minutos.

Las placas se destiñeron en una solución de ácido acético glacial al siete por ciento.

### III RESULTADOS

La extracción de las proteínas cromosomales no histónicas ha planteado algunos problemas por sus características fisicoquímicas, no solo por su heterogeneidad, sino también por su tendencia a agregarse con las histonas y entre ellas mismas.

Los métodos tan drásticos usados en su extracción tienden a cambiar sus propiedades iniciales, sin embargo, conservan sus características fundamentales que les permite reaccionar de manera específica con la cromatina reconstituida (37).

En el caso de las plantas, existen algunas otras dificultades como el problema de romper los tejidos por medios suaves. Este problema no fué tomado en cuenta al principio del trabajo, y los rendimientos eran tan bajos que no era posible trabajar con las cantidades obtenidas. Usualmente los tejidos vegetales se rompen con métodos mas drásticos que los usados para los tejidos animales, esto hace difícil la extracción de núcleos porque la homogeneización violenta daña una gran cantidad de núcleos. En la tabla 1, se describen los rendimientos típicos alcanzados con el método descrito mas adelante, estos rendimientos reflejan mas bien las características de los diferentes tejidos. El embrión es un tejido que no contiene básicamente tejidos parenquimatoso, y por ello el rendimiento en relación a su peso seco es mas alto, mientras se va desarrollando, la pared celular de los nuevos tejidos (raíz y callo), hace mas difícil su extracción, y existe menos células por grano en peso fresco.

Otro problema en el uso de tejidos vegetales, es la presencia de compuestos fenólicos que son extraídos junto con las proteínas

TABLA N° 1

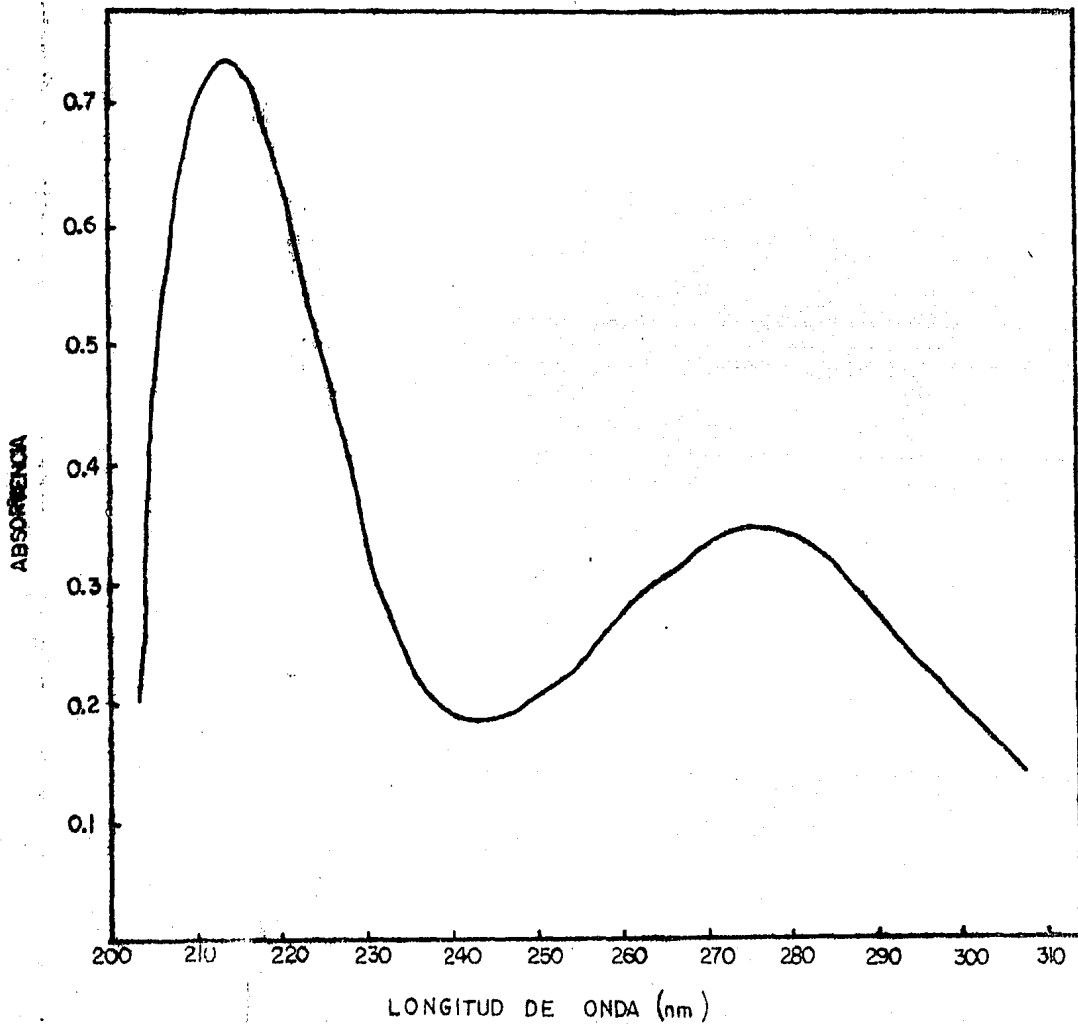
## RENDIMIENTO DE PROTEINAS CROMOSOMALES NO HISTONICAS EN DIFERENTES TEJIDOS

TEJIDOS	PESO (g)	PCNH (m <sub>c</sub> )	Rendimiento mg/g peso frescc.
Embrión	12	9.6	0.8
Embrión (48 horas de germinación)			
Embrión (72 horas de germinación)	2.05	1.13	0.8
Embrión (6 días de germinación)	4.0	0.1	0.025
Embrión (40 horas de germinación en 2,4-D)	1.2	0.72	0.16
Embrión (72 horas de germinación en 2,4-D)	3.42	0.11	0.16
Callo de seis días	0.72	0.11	0.16

La extracción de las proteínas se llevó a cabo homogeneizando los materiales congelados, y añadiendo una solución de Tris 0.05 M (pH 8) para continuar la homogeneización en un aparato Politrón, el homogeneizado se filtró a través de gasa y malla de nylon de 86 micras de poro. El filtrado se centrifugó varias veces a 10 000 XG a 4°C, el precipitado se centrifugó finalmente sobre un colchón de sacarosa 1.7 M durante dos horas a 32 000 rpm en un rotor Spinco a 4°C. La cromatina obtenida se resuspendió en NaCl 2 M, después de haber sido dializado contra Tris 0.01 M (pH 8). Las proteínas cromosomales no histónicas se precipitaron en frío añadiendo H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para llevar la solución a 0.2 N, se recuperan las proteínas por centrifugación. Se resuspenden en Tris 0.01 M (pH 9), se dializan y se cuantifican por Lowry (51).

FIGURA N° 1

ESPECTRO DE ABSORCIÓN DE PCNH DE EMBRION

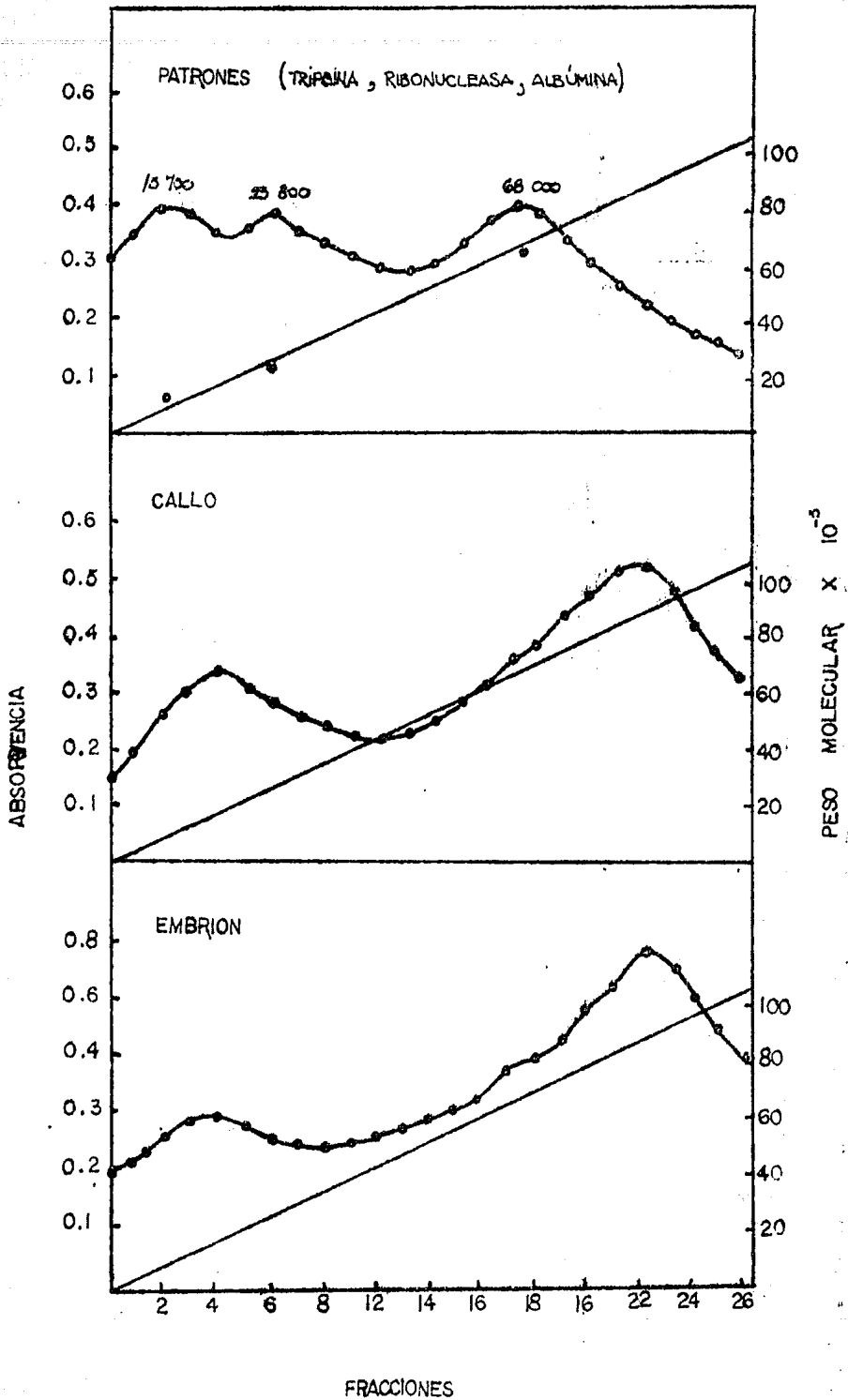


no obstante los pasos de purificación. Esto no sería especialmente grave si no fuera porque los compuestos fenólicos interfieren fuertemente en dos de los métodos mas importantes para la determinación de concentraciones de proteínas: el método de Lowry, y la absorvencia a 280 nm, ambos métodos hacen uso de la presencia de compuestos aromáticos para determinar la presencia de proteínas de manera cuantitativa por medio de sus residuos aromáticos. La interferencia de los compuestos fenólicos es además compleja, porque sus características cambian dependiendo del pH en el que se encuentran, y son muy sensibles al cambio en fuerza iónica también. Así que a pH ácido la interferencia es mucho menor, pero al aumentar la basicidad la interferencia es tan grande que se hace imposible tener siquiera una vaga idea de las concentraciones reales de las proteínas obtenidas. El pH usado para determinar las proteínas por su absorvencia a 280 nm era de 8.5 y es a este pH al que llegan los valores mas altos de absorvencia para los polifenoles.

El problema de los polifenoles pudo evitarse en cierta medida, aunque no totalmente, al usarse en los primeros pasos de extracción de las proteínas la Polivinil pirrolidona, este compuesto precipita los compuestos fenólicos. La reducción en la cantidad de polifenoles fué muy grande, pero los polifenoles remanentes fueron suficientes como para interferir con las determinaciones de proteínas por el método de Lowry.

No obstante este problema, se pudieron obtener proteínas de excelente aspecto, esto es, un polvo blanco en comparación al obtenido sin el uso de la polivinil pirrolidona que producía un polvo amarillo. A estas proteínas se les determinó su espectro de absorción en el ultravioleta para verificar su pureza, no solamente por la posibilidad de contaminación de compuestos fenólicos sino para eliminar la posibilidad de

FIGURA N° 2 GRADIENTE DE SACAROSA



contaminación con ácidos nucleicos. En la figura 1 se puede apreciar que existen dos picos máximos, uno entre 210 y 220 nm, y el otro entre 275 y 280 nm, este último corresponde sobre todo a los compuestos aromáticos, y se considera característico de las proteínas en comparación a los ácidos nucleicos.

Se encuentra sin embargo un pequeño hombro entre 250 y 260 nm, esto indica que existe una pequeña contaminación con ácidos nucleicos, sin embargo es solo de aproximadamente 0.8 % en relación a las proteínas (para esto se usó el método colorimétrico de la hidroxilamina (53)).

Para obtener una idea de los pesos moleculares de estas proteínas se llevaron a cabo gradientes de sacarosa de 5 a 20 %. Según se puede apreciar en la figura 2, existen dos poblaciones de proteínas cromosomales en muestras de callo y embrión, según los patrones usados, una de las poblaciones tendría un peso molecular de aproximadamente 28 000 como promedio, y la otra población tendría un peso molecular de aproximadamente 85 000 daltones.

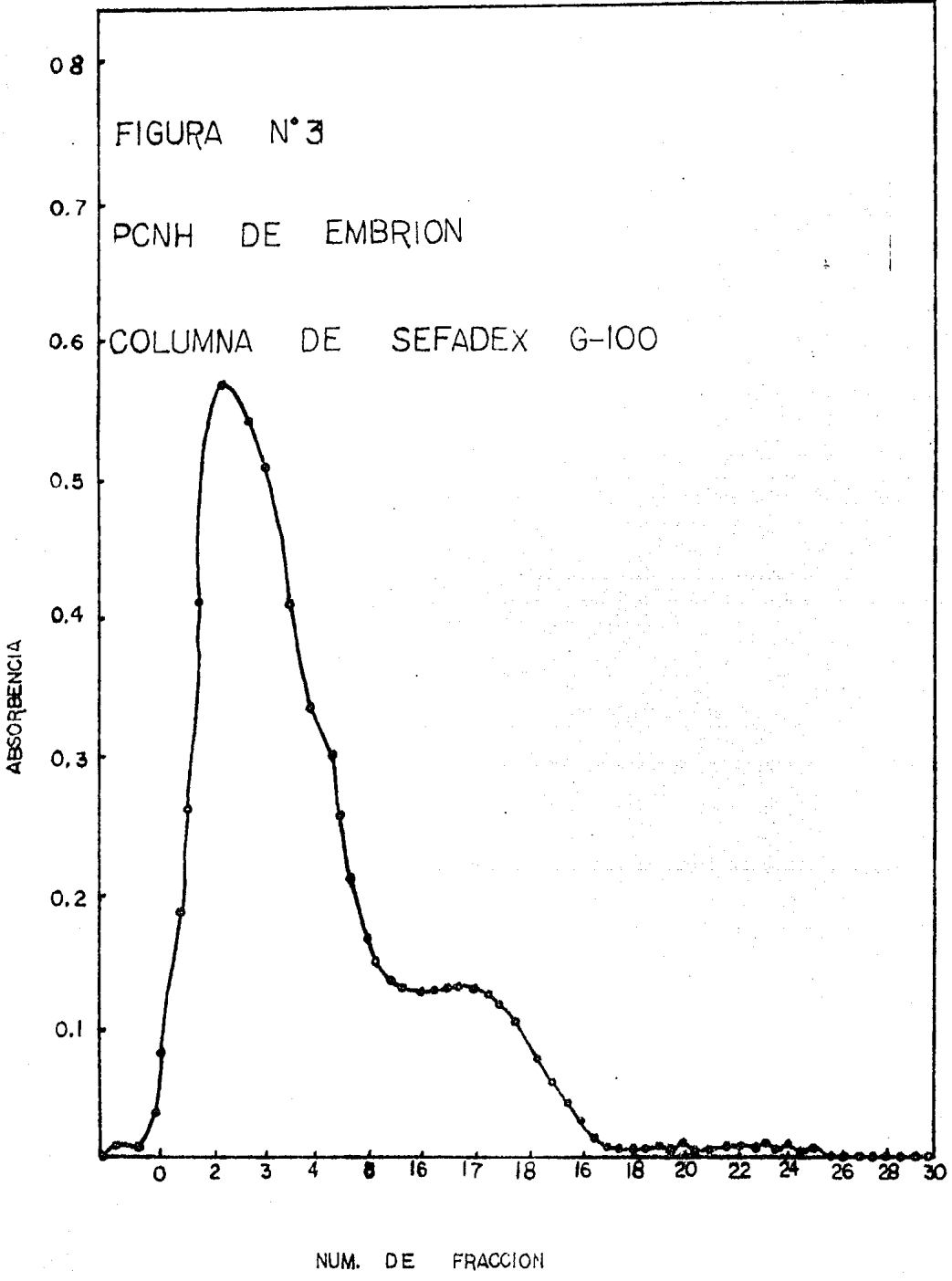
Como puede verse en las muestras de callo y de embrión, ambas poblaciones están presentes con casi exactamente el mismo peso molecular promedio para ambas poblaciones, sin embargo es de hacerse notar que las proporciones cuantitativas entre los dos picos en las dos muestras no es igual.

La muestra de embrión presenta una mayor proporción del pico de alto peso molecular (aproximadamente 20 % mayor) mientras que la muestra de callo presenta un pico de bajo peso molecular más grande y en mayor proporción que el de embrión (aproximadamente del 15 %).

Para comprobar la existencia de estas poblaciones se pasaron las proteínas de embrión por una columna de Sephadex G-100, esta puede verse en la figura 3, aquí puede apreciarse que las proteínas empie-



REVISTA DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



zan a salir inmediatamente despues del volumen vacfo, esto es, tienen un peso molecular de aproximadamente 100 000, o mayor, y esta es la población mayoritaria, en esta población existe un hombro que indica que la población no es homogenea. Existe un pico mas pequeño que representa otra población bien definida, y que corresponde quizá a la población de peso molecular inferior en el gradiente de sacarosa.

La existencia de un pico tan abundante en el límite de los 100 000 daltones podría indicar la agregación de las protefmas en agrupaciones de alto peso molecular. Por los dos métodos anteriores (gradiente de sacarosa y columna de Sephadex G-100) no fué posible separar mas de dos poblaciones y la aparición de algunos hombros que podrían indicar otro tipo de poblaciones, y la aparición de algunos hombros que podrían indicar otro tipo de poblaciones fué muy limitado.

Pensando en las características iónicas de estas protefmas se encontró que podrían ser separadas con mayor amplitud en columnas de intercambio iónico, especialmente de intercambio catiónico. Efectivamente pudieron separarse alrededor de 10 picos en cada una de las muestras usadas.

Las columnas se corrieron usando gradientes de cloruro de sodio. El primero (0.0 a 0.1 M) produjo la separación mas clara, habiendo 4 picos en esta región en las muestras obtenidas de embrión raíz, y cinco en la muestra de callo (figuras 4,5 y 6).

La muestra de embrión produjo cuatro picos en el rango de 0.0 a 0.1 M de Na Cl, estos picos fueron lo bastante reproducibles en todas las muestras usadas como para determinar la fuerza iónica de elución. El primer pico se eluyó en aproximadamente 0.02 M, el segundo en 0.06 M, y el tercero en 0.08 M, y el último antes de empezar el si-

guiente gradiente, esto es, se eluyó a 0.1 M.

El segundo gradiente (0.1 a 0.4 M) produce cuatro picos, aunque no muy bien diferenciados, sin embargo estos picos reproducen en diferentes corridas con diferentes muestras, la reproducción de estos picos no sigue las mismas proporciones relativas de unos a otros, pero los lugares de elución se conservan; esto se debe quizá a diferencias en el manejo de las extracciones, en donde algunas proteínas fueron extraídas en condiciones ligeramente diferentes en sus proporciones, sin embargo las especies son las mismas porque eluyen con la misma fuerza iónica.

El gradiente de 0.4 a 1.0 M nos da menos información, no aparecen picos bien definidos, y los patrones varían de muestra a muestra, aunque las variaciones no fueron drásticas.

Los fenólicos remanentes en la muestra salen usualmente al final de este gradiente al eluir la columna con un exeso de NaCl 1.0 M los contenidos de las fracciones se vuelven amarillentas, y la absorvencia sube grandemente. La elución de los fenólicos es man grande si se usa una solución de NaCl 2,5 M, inmediatamente después de terminado el gradiente.

A diferencia del perfil de elución del embrión, y la raíz, el callo produce cinco picos. Existe un pico que eluye a 0.01 M, en seguida se eluyen otros picos, eluyendo a 0.04, 0.045 y 0.06 M, al terminar el gradiente se eluye otro pico, que, como en el caso del embrión, esta en el límite del siguiente pico, como en el caso del embrión y la raíz, la reproducibilidad del patrón obtenido en esta región fué bastante bueno.

En el siguiente gradiente se acaba de eluir la proteína que se empezó a eluir en el gradiente anterior. En este gradiente puede

FIGURA N° 4

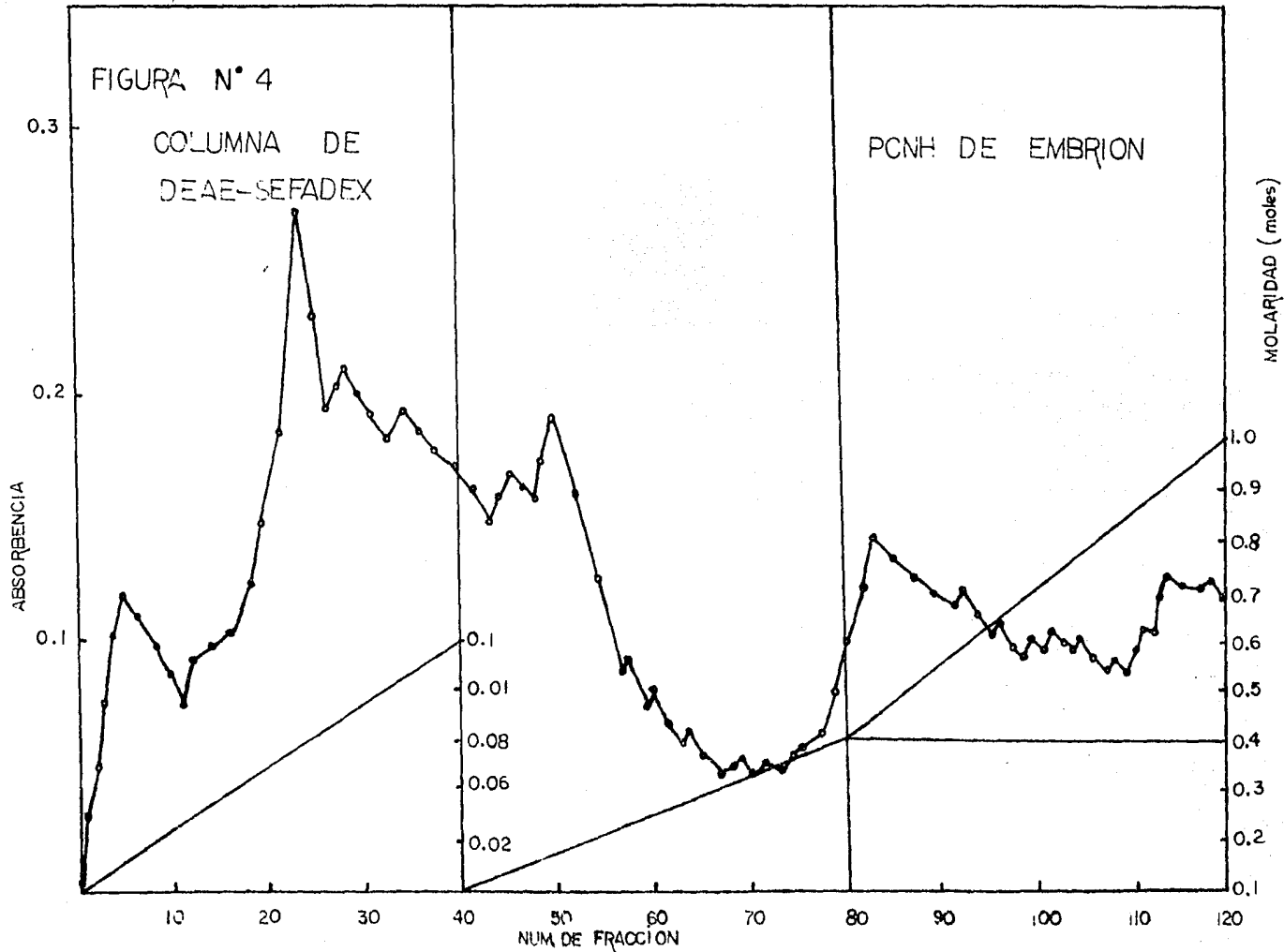


FIGURA N° 5

COLUMNA DE  
DEAE-SEFADEX

PCNH DE RAIZ

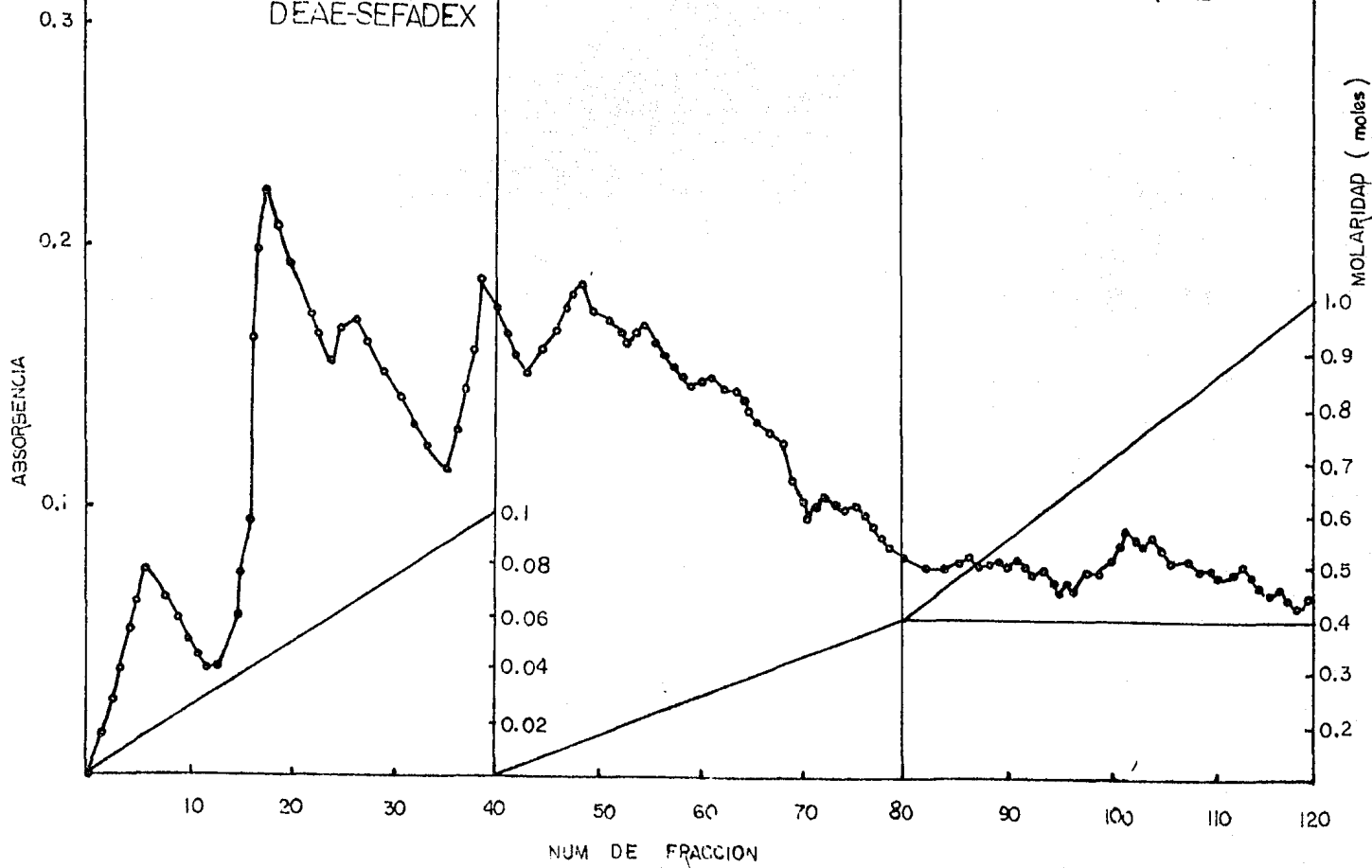


FIGURA N° 6

COLUMNA DE  
DEAE-SEFADEX

PCNH DE CALLO

ABSORBENCIA

MOLARIDAD (moles)

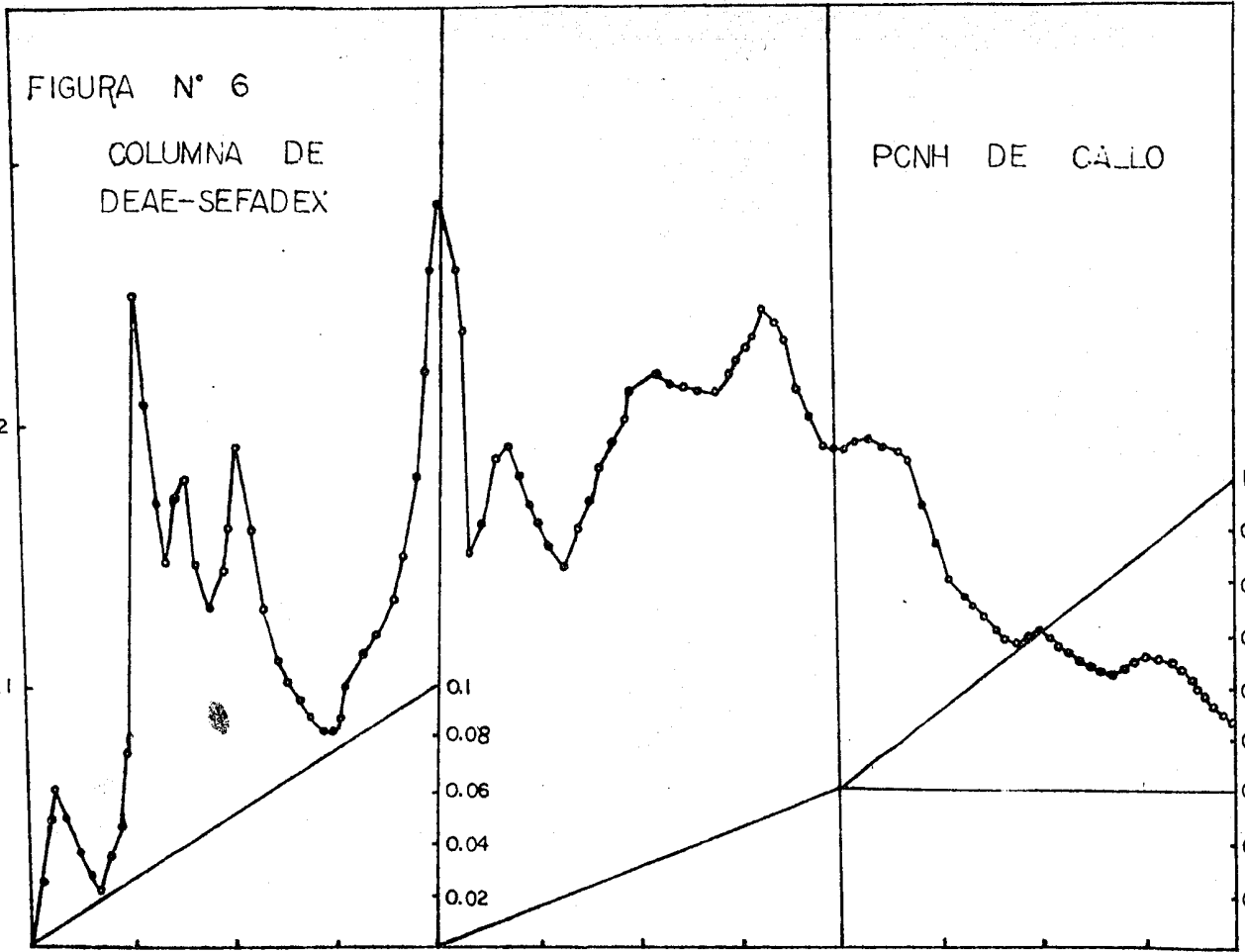
0.3  
0.2  
0.1

0.1  
0.08  
0.06  
0.04  
0.02

1.0  
0.9  
0.8  
0.7  
0.6  
0.5  
0.4  
0.2

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120

NUM DE FRACCION



verse solamente tres picos, con algún hombro indicando la heterogeneidad de ese pico. El último gradiente no tiene picos bien diferenciados, y es solamente la elución de poblaciones heterogéneas de proteínas, esta parte es la menos reproducible de gradiente a gradiente. La elución de polifenoles después de 1.0 M es menor en callo, porque las proteínas extraídas de este tejido siempre estuvieron más libres de fenoles que las otras muestras, de tal manera que las fracciones posteriores a 1.0 M cayeron rápidamente a 0.0 de absorbencia, lo que podría indicar que prácticamente todas las proteínas de la muestra usadas se eluyeron hasta 1.0 M.

La muestra de raíz presenta características generales similares a las muestras anteriores, el primer gradiente contiene cuatro proteínas, la primera se eluye alrededor de 0.02 M, la segunda y la tercera, alrededor de 0.06 y 0.07 M respectivamente, en este caso existe también una proteína que se eluye al terminar este gradiente.

El siguiente gradiente muestra de nuevo picos poco diferenciados, y el último gradiente da una definición de especies muy pobre. En este caso los compuestos fenólicos son especialmente abundantes, y eluyen después de terminado el gradiente.

Para encontrar las diferentes especies de polipéptidos que se encuentran en la muestra, se corrieron diferentes preparaciones de proteínas en placas de poliacrilamida con SDS.

Se encontró que en todas las muestras (embrión, embrión a las 48 horas y 72 horas de germinación, raíz de 6 días, y embrión a las 48 y 72 horas de tratamiento con 2,4-D, y callo de 6 días de inducción) muestran una gran cantidad de proteínas idénticas en su corrimiento; y una gran proporción de las proteínas corren exactamente igual, por lo que probablemente sean las mismas especies de polipéptidos (Figura 7).

El hecho de que hayan producido patrones tan similares, no es una indicación de que los polipéptidos sean iguales, los resultados de análisis de aminoácidos así lo demuestran como lo veremos mas adelante.

Lo mas sobresaliente de los patrones producidos en las placas, es la aparición de bandas de alto peso molecular en las preparaciones de callo, y que aparecen también en las muestras de las proteínas extraídas del embrión a las 72 horas en tratamiento con 2,4-D para la producción de callo. Estas proteínas de alto peso molecular aparecieron con diferentes extracciones de callo, indicando que las bandas son reales. Algo que se reprodujo con regularidad es la forma cuantitativa de estas bandas, siempre aparecen en pares y sus relaciones cuantitativas parecen ser iguales, esto es, parecen ser proteínas con pesos moleculares muy similares, y se producen en cantidades aparentemente similares.

Otros cambios importantes en los patrones electroforéticos son ciertos cambios cuantitativos relativos entre diferentes especies, aunque no siempre fué reproducible esta variable; y en algunos casos parece ser mas del azar que realmente cambios producidos en el patrón de estas proteínas intracelularmente. Pequeñas diferencias en la extracción puede producir estos resultados.

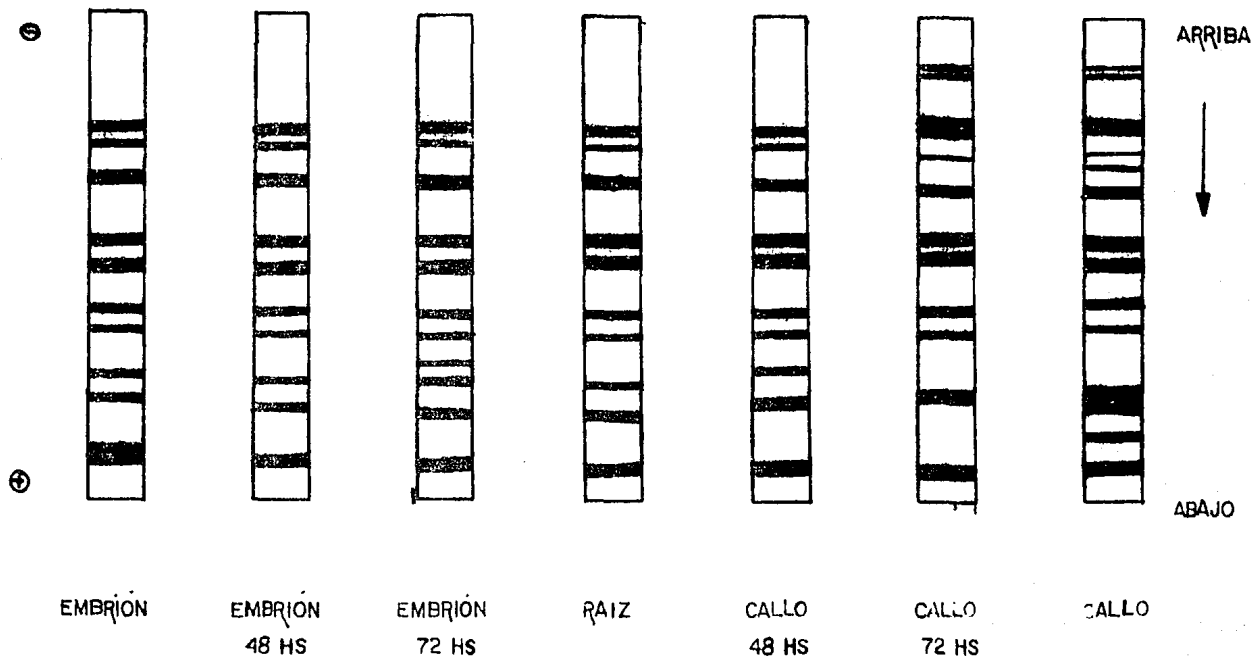
La composición de aminoácidos puede ser una buena medida de las similitudes o diferencias entre estas proteínas. Por lo tanto se hicieron análisis replicados de muestras de PCNH de raíz callo y embrión, los resultados se muestran en la tabla 2. Como se esperaba, los aminoácidos ácidos son los más abundantes en las tres muestras. Mientras que el embrión tiene proteínas cromosomales no histónicas muy altas en su contenido de ácido glutámico comparado con el contenido de ácido aspártico,



FIGURA N° 7

PATRÓN ELECTROFORÉTICO DE LAS PROTEINAS CROMOSOMALES

NO HISTÓNICAS EN PLACAS DE SDS-POLIACRILAMIDA



las proteínas de raíz y callo tienen mayor cantidad de ácido aspártico que de glutámico, aunque las diferencias no son tan amplias como en el caso del embrión. En todos los casos la glicina, la leucina, la alanina y la serina están en grandes cantidades relativas, aunque el orden en que se encuentran en la tabla no guardan la misma relación; por ejemplo, mientras que en el embrión la leucina es el cuarto aminoácido en abundancia con 8.5 %, en callo es el séptimo con el 6.5 %.

Otro aspecto importante es la presencia de metionina en las muestras de raíz y callo, mientras que en el embrión no se encontró en varias determinaciones. Además la cisteína no se encontró en ninguna de las muestras.

Los aminoácidos básicos no se encuentran en bajas concentraciones, todo lo contrario, se encuentran en concentraciones relativamente altas.

Los aminoácidos aromáticos se encuentran en las concentraciones más bajas, esto es quizá la causa del bajo coeficiente de extinción molar a 280 nm que ya se había observado, en el transcurso de las determinaciones.

Un aspecto muy interesante es el hecho de que las preparaciones de raíz y callo parezcan tan similares, mientras que las de embrión sean significativamente diferentes, como puede apreciarse en la tabla 2, las cantidades porcentuales de la muestra de raíz y callo son muy similares, mientras que en las de embrión, aunque guardan un orden similar, las cantidades son diferentes. La relación de aminoácidos ácidos (ácidos aspártico y glutámico) contra aminoácidos básicos (lisina y arginina) es diferente en las diferentes muestras, en el embrión es de 2.1, lo que es relativamente alto; tomando en cuenta que para las proteínas cromosomales

TAELA N° 2

CONTENIDO DE AMINOACIDOS EN PROTEINAS CROMOSOMALES NO HISTONICAS EN  
 POR CIENTO DEL TOTAL DE LOS AMINOACIDOS DETERMINADOS.

Aminoácido	embrión	raíz	caldo
Acido glutámico	16.2	12.2	12.6
Acido aspártico	12.4	14.5	14.0
Glicina	9.1	8.2	8.0
Leucina	8.5	7.4	6.5
Alanina	7.8	8.1	8.5
Serina	7.6	8.5	8.3
Lisina	6.8	7.2	7.4
Arginina	6.8	7.2	7.4
Histidina	6.2	6.2	6.0
Treonina	5.6	6.6	6.8
Prolina	4.8	4.2	5.4
Valina	3.0	4.4	4.2
Isoleucina	2.4	2.1	2.0
Fenilalanina	1.4	2.2	2.5
Tirosina	1.2	0.8	0.6
Metionina	—	0.6	0.8
Cisteína	—	—	—
<u>Asp+Glu</u> <u>Lis+Arg</u>	2.1	1.2	1.87

Los aminoácidos no tomados en cuenta son: asparagina y glutamina. Los valores de ácido glutámico están restados en cantidades iguales del contenido de amoniaco desprendidos de la asparagina y la glutamina. El triptofano no se determinó (se descompone durante la hidrólisis ácida).

La determinación se hizo en un aparato Labotrón Chromatocord de una muestra hidrolizada en HCl 5 N durante 24 horas a 100° C, y resuspendiendo — después de eliminar el ácido clorhídrico, en una solución de citrato 0.2 M (pH 2.2). Los resultados son el promedio de tres determinaciones.

no histónicas de otras especies vegetales es de aproximadamente 1.8. Las relaciones para raíz y callo son de 1.9 y 1.8 respectivamente, lo que las hace de nuevo más similares entre sí, pero diferentes en relación encontrada para embrión.

Ya que la cantidad de fosforilaciones en una proteína cambia radicalmente sus características iónicas, y por la importancia que se le ha asignado a la fosforilación de las proteínas cromosomales, se determinó la existencia de fosforilación en las tres muestras estudiadas.

Los resultados obtenidos muestran una diferencia en la cantidad de fosforilaciones entre las muestras (tabla 3). La raíz y el embrión revelaron cantidades similares de fósforo, mientras que el callo parece tener menos fosforilaciones en sus proteínas cromosomales no histónicas. Las cantidades para raíz y embrión fueron de 0.96 y 1.02 microgramos de fósforo (como fosfato) por miligramo de proteína respectivamente, eso daría aproximadamente 4 fosfatos por cada 100 aminoácidos, mientras que en el caso del callo, con 0.63 microgramos de fosfato por miligramo de proteína tiene solamente 2.5 aminoácidos fosforilados por cada 100 aminoácidos. La proporción de serina en las tres muestras es entre 7.5 y 8.5 % lo que haría pensar que no todas las serinas están fosforiladas; en el caso de las proteínas de la raíz y el embrión aproximadamente la mitad están fosforiladas, mientras que solo una tercera parte de las de callo estarían fosforiladas. Esto suponiendo que todas las fosforilaciones existieran solamente en las serinas.

Asumiendo que el peso molecular promedio de las proteínas es de 40 000 daltones (promedio aproximado de las muestras, y promedio de otras proteínas cromosomales no histónicas de otras especies), la

TABLA N° 3

CONTENIDO DE FOSFORO EN PROTEINAS CROMOSOMALES NO HISTONICAS OBTENIDAS DE CALLO, EMBRION Y RAIZ; USANDO EL METODO DE FISKE Y SUBAROW.

	RAIZ	CALLO	EMBRION
Fosfato en microgramos por mg de proteína. (promedio de tres determinaciones)	0.96	0.63	1.02
Fosfatos/100 aminoácidos	4	2.5	4
Fosfatos en proteínas de 40 000 Daltones	8	5	8
Serinas fosforiladas (en por ciento)	52%	28 %	47 %

A las preparaciones de proteínas se les añadió 25 U de DNasa por mililitro, dializando contra agua a 32°C durante 18 horas. Cuando la digestión se completó, se agregó una gota de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado fumante, y se evaporó a la flama, cuando el contenido se volvió café, se enfrió, y se añadió una gota de ácido nítrico 2 N calentando a la flama hasta que desprendió vapores blancos. Cuando se ha enfriado, se agrega 1 ml de agua y se pone en agua hirviendo por 5 minutos. La solución resultante se usa para la determinación de fosfatos por el método de Fiske y Subarow (54).

cantidad de fosforilaciones por proteína sería de ocho en el caso de la raíz y el embrión, mientras que en las proteínas de callo sería de solamente cinco.

#### IV DISCUSION

Uno de los aspectos importantes del trabajo era la pureza de las proteínas cromosomales no histónicas, ya que la interpretación de los resultados tendrían que depender de este punto.

Los contaminantes mas difíciles de eliminar de la cromatina de plantas son almidón, celulosa y compuestos fenólicos.

En nuestras preparaciones fué posible eliminar los contaminantes por ácidos nucleicos, almidón y celulosa, como se ha reportado previamente (41); sin embargo la contaminación por los fenólicos no fué totalmente resuelto, no obstante el uso de la polivinil pirrolidona. Esto se debe quizá a que las características iónicas de los polifenoles y las proteínas cromosomales no histónicas son similares (se encuentran cargados negativamente a pH básico y precipitan a pH ácido), lo cual debe propiciar una interacción de tipo iónico muy fuerte, o incluso covalente, porque no se eliminan durante la diálisis.

Cuando las proteínas estuvieron aisladas, se intentó una primera separación en base a su peso molecular, de las especies, por medio de columna de Sephadex y gradiente de sacarosa. Se ha reportado previamente que existen poblaciones de estas proteínas de alto y bajo peso molecular en animales, y que corresponden a funciones diferentes dentro de la cromatina (8); estas poblaciones no se han reportado en plantas. En este trabajo encontramos estas dos poblaciones, en columna de Sephadex G-100 (figura 1) existen dos picos, uno en el límite de los 100 000 daltones y otro heterogeneo de peso molecular mas bajo. En el caso del gradiente de sacarosa, existen de nuevo dos poblaciones, una de ellas con peso molecular ligeramente por debajo de los 100 000 daltones de peso molecular, y el otro por debajo de los 20 000 daltones. Las dos muestras empleadas

para fines de comparación; callo y embrión, resultaron iguales en el peso molecular promedio de las dos poblaciones, pero las proporciones de ambas poblaciones es diferente, el embrión tiene una mayor proporción de proteínas de alto peso molecular, mientras que el callo las tiene de bajo peso molecular. Se ha comprobado, por otra parte, que las proteínas cromosomales no histónicas tienden a agregarse unas con otras; en este caso, pues, la población de alto peso molecular podría ser la asociación de estas proteínas, existiendo entonces en dos formas, una asociada y otra libre; pero las especies podrían ser las mismas. Sin ser excluyentes, podrían existir verdaderamente proteínas de peso molecular alto, y no solamente agregados de polipéptidos de bajo peso molecular. Sin embargo como se verá mas adelante, no existen en geles de poliacrilamida una proporción alta de polipéptidos de tan alto peso molecular; pues como se puede ver en la figura 1, estos corresponden a mas de la mitad de las proteínas, y lo mismo puede apreciarse en los gradientes de sacarosa (figura 2). Las diferencias en proporción, entre las muestras de embrión y callo, podrían representar diferencias en las especies de bajo peso molecular, o en sus características iónicas que producirían una menor capacidad de producir los agregados de alto peso molecular.

Para acercarse a una hipótesis de la función de las proteínas cromosomales no histónicas, es indispensable saber si existen diferencias entre las proteínas presentes en diferentes tejidos y diferentes especies. Una forma de aproximarse a este conocimiento es mediante el análisis de composición de aminoácidos de dichas poblaciones, lo que proporciona algunos elementos de juicio acerca de la importancia de algunos aspectos como la existencia o ausencia de aminoácidos sulfurados, la concentración de aminoácidos ácidos y básicos, y la presencia de aminoáci-



dos fosforilable (sobre todo serina).

Se ha encontrado en otros sistemas que las proteínas cromosomales no histónicas son especialmente bajas en sus contenidos de metionina y cisteína (8); por otra parte se ha determinado que la proporción de aminoácidos ácidos/básicos, es de 1.8 en plantas, mientras que en animales el rango es mas grande. La alta proporción se debe sobre todo al contenido de aminoácidos ácidos y la baja concentración de aminoácidos básicos. En este trabajo se encontró que, como en el resto de los análisis publicados, la proporción de aminoácidos sulfurados es baja; encontrandose en este caso ausencia de cisteína en las tres muestras estudiadas (embrión, raíz y callo) según la metodología empleada, y ausencia de metionina en uno de los casos (embrión). Las proporciones de aminoácidos es casi igual en las muestras de proteínas de callo y raíz, mientras que el embrión mostró diferencias notables. Bioquímicamente se han encontrado similitudes entre el callo y la raíz, especialmente en algunas características enzimáticas (58, 59), lo que refuerza esta noción.

Para poder determinar con mayor precisión las diferencias entre las proteínas cromosomales no histónicas de raíz, callo y embrión, se llevaron a cabo análisis electroforéticos en placas de poliacrilamida con SDS; ya que se parte del mismo tejido (embrión) para llegar a dos tejidos diferentes (raíz y callo), se determinaron también estadios intermedarios en tiempo hacia los dos extremos (raíz y callo).

En estudios similares no se han encontrado diferencias entre ciertos tejidos de plantas, aunque no se usaron callos ni raices (35, 44) en otros casos las diferencias son muy pequeñas, en este caso no se estudiaron tejidos no diferenciados como el callo (39). En los análisis en los que se ha seguido un desarrollo a través del tiempo,

se han encontrado variaciones en la germinación del trigo (51), en el ciclo celular de la Spirogira (21), y la influencia del 2,4-D en plántulas de chícharo (43, 44), pero en ningún caso se usaron callos ni raíces, sino el desarrollo completo del embrión o la plántula completa.

En nuestro caso encontramos que no hay diferencias marcadas en las proteínas cromosomales no histónicas a través del desarrollo de la raíz, y la formación del callo, ni los productos finales de este desarrollo. En cambio, mas sobresaliente es la aparición de dos bandas de alto peso molecular a las 72 horas de tratar la semilla con 2,4-D (esta auxina sintética se requiere para la formación del callo); estas proteínas no son agregados moleculares puesto que los geles están corriendo en SDS, de tal manera que lo que se ve son polipéptidos independientes. El origen de estas proteínas de alto peso molecular puede ser por la acumulación de un precursor de alto peso molecular no degradado, y en este caso la causa de la existencia de estas proteínas sería la inhibición de alguna proteasa, por efecto de la presencia del 2,4-D en el medio, de manera directa o indirecta. Por otra parte, la presencia de metionina en las muestras extraídas de callo y raíz muestran la existencia de síntesis de nuevas proteínas durante los procesos de desarrollo a partir de embrión, puesto que el embrión tiene proteínas cromosomales no histónicas que carecen de metionina.

La interacción de las proteínas cromosomales no histónicas con el complejo de DNA-histonas ha sido una de las hipótesis para explicar la acción de estas proteínas (9); el mecanismo de acción sería iónico, por ello es importante el estudio de las características iónicas de estas proteínas.

FIGURA N° 8

COLUMNAS DE  
DEAE-SEFADEX

— PCNH DE CALLO

- - - PCNH DE EMBRION

ABSORBENCIA

GRADIENTE DE 0,0 A 0,1 M

DE 0,1 A 0,4 M

DE 0,4 A 1,0 M

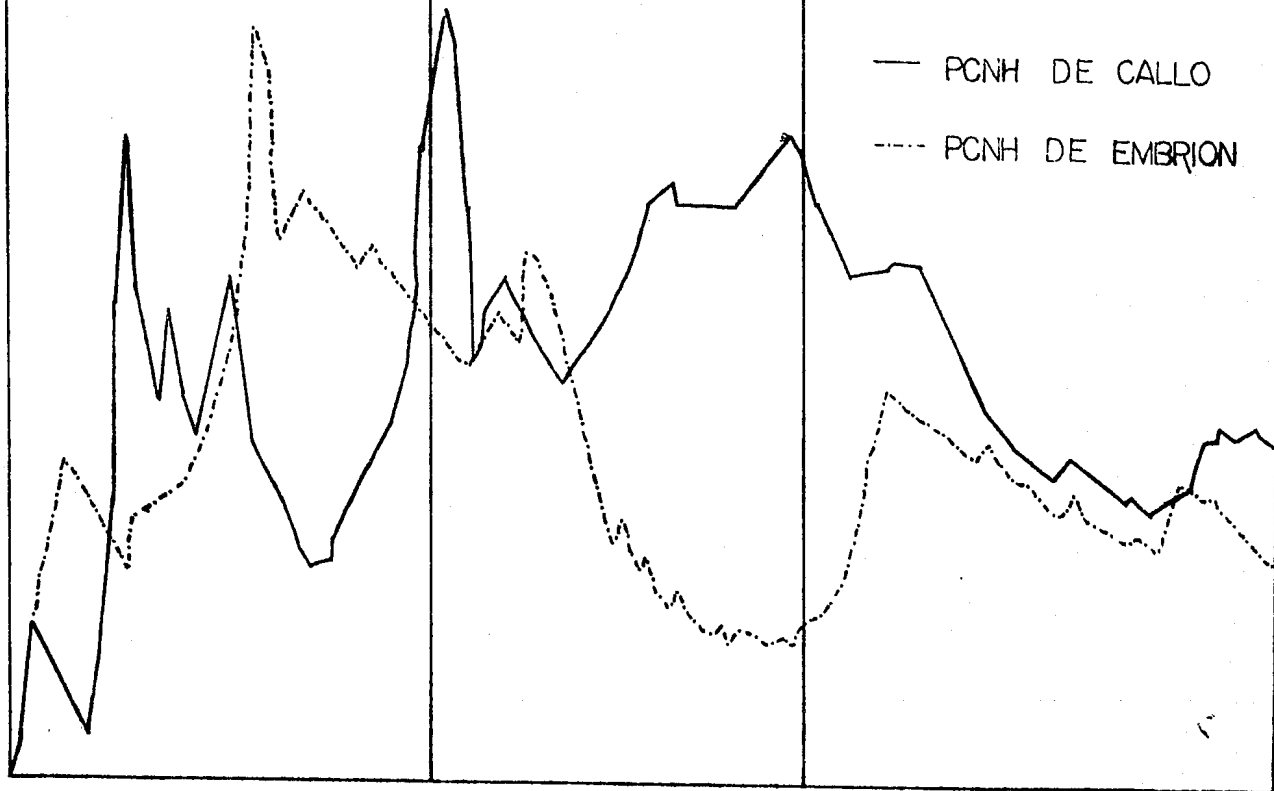
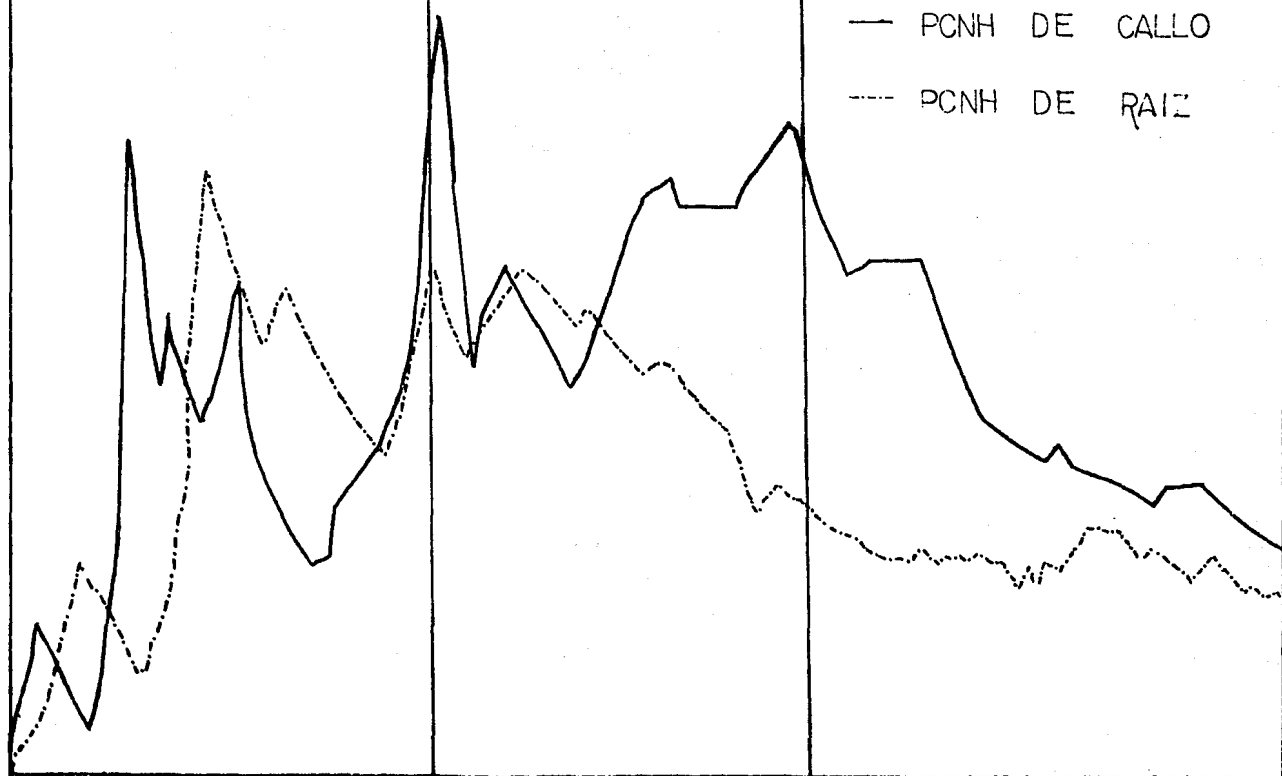


FIGURA N° 9

COLUMNAS DE  
DEAE-SEFADEX

— PCNH DE CALLO

- - - PCNH DE RAIZ



GRADIENTE DE 0.0 A 0.4M

DE 0.1 A 0.4M

DE 0.4 A 1.0M

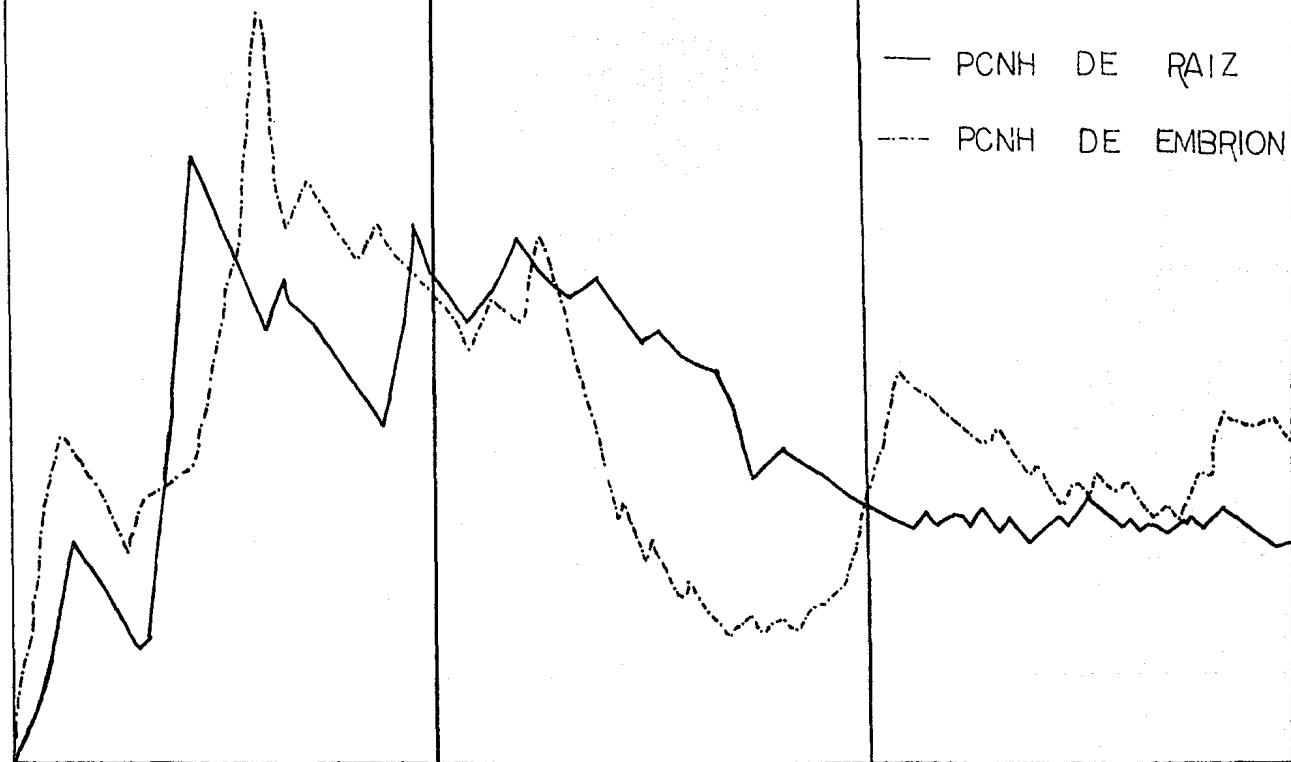
ABSORBENCIA

FIGURA N° 10

COLUMNAS DE  
DEAE-SEFADEX

— PCNH DE RAIZ

- - - PCNH DE EMBRION



GRADIENTE DE 0.0 A 0.1 M

DE 0.1 A 0.4 M

DE 0.4 A 1.0 M

ABSORBENCIA

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

Los estudios de las características iónicas de estas proteínas en plantas son pocos, y se han orientado a la interacción de las proteínas cromosomales no histónicas con el complejo DNA-histonas directamente; los resultados indican que no hay una aparente especificidad hacia la cromatina (complejo DNA-histonas), de muestras provenientes de diferentes tejidos (32), sin embargo, los patrones de RNA producidos de la transcripción de los diferentes complejos reconstituidos DNA-histonas, son diferentes (43). En nuestro caso encontramos diferencias en los patrones de elución en columnas de DEAE-celulosa de PCNH de los diferentes tejidos usados, lo cual indica **diferencias** en las características iónicas entre las muestras de callo, embrión y raíz. Como puede verse en las figuras 8,9 y 10, la parte del gradiente mas clara y reproducible (gradiente de 0.0 a 0.1 M) muestra que las preparaciones provenientes de raíz y embrión son similares, mientras que comparando callo y embrión (figura 8) se advierte una gran diferencia que es menor al comparar los patrones de callo y raíz (figura 9). Según estos resultados, y comparando los patrones electroforéticos obtenidos (figura 7), puede afirmarse que las diferencias iónicas entre estas preparaciones es mucho mayor que sus diferencias en especies en base a su peso molecular. La similitud entre embrión y raíz puede ser la expresión de sus funciones bien definidas dentro de la planta, en donde los tejidos no tienen tanta diferenciación morfológica y bioquímica como los tejidos animales (7). Las diferencias entre embrión y callo por otra parte, son mas aparentes y hacen pensar que no comparten ni funcionalmente ni morfológicamente muchas similitudes, esto no esta estudiado con amplitud, pero los pocos reportes a nivel bioquímico que existen (60, 59) apoyan esta afirmación. El origen de las diferencias iónicas puede ser la diferencia real entre las proteínas y no solamente cambios en las fosforilaciones u otras

modificaciones (acetilaciones etc.); esto estaría apoyado por los datos en las diferencias en composición de aminoácidos; pero estaría en contradicción con los patrones de geles de acrilamida, una forma de que estos datos fueran congruentes, es pensar que los resultados de los geles de poli-acrilamida representan poblaciones de proteínas del mismo peso molecular de las diferentes preparaciones, y no proteínas individuales y específicas per se.

Las fosforilaciones son una de las modificaciones más comunes entre las proteínas cromosomales; por ello se decidió hacer un análisis cuantitativo de fósforo entre las preparaciones de los diferentes tejidos.

En animales se ha comprobado en algunos casos, el reconocimiento diferencial que de la cromatina (complejo DNA-histonas) hacen las proteínas cromosomales no histónicas fosforiladas y sin fosforilar (57), sin embargo en otros casos esto no se ha comprobado (9). En plantas se han encontrado ciertos cambios en los patrones electroforéticos de proteínas fosforiladas durante la germinación (45); sin embargo, en el caso de los estudios en haba, esto no sucedió (32). En el caso de la acción del 2,4-D sobre plántulas de chícharo, se comprobó que hay cambios en los patrones de fosforilación (42). En el presente estudio los resultados cuantitativos mostraron que al igual que lo reportado en otros tejidos de plantas (9), existen aproximadamente cuatro fosforilaciones por cada 100 aminoácidos en los embriones y en la raíz del trigo, lo que significa que no difieren de los tejidos en los que se ha reportado este dato. En contraste, las determinaciones en el callo, mostraron una situación atípica, porque este presentó solamente 2,5 fosfatos por cada 100 aminoácidos. Si el peso molecular promedio de las

proteínas fuera de 40 000 daltones (9), habría 8 fosforilaciones por proteína (en embrión y raíz), y en el caso del callo habría solamente 5 fosforilaciones por proteína. Las diferencias en fosforilación podrían ser la explicación de los cambios iónicos de las proteínas que se reflejaría en el proceso de la diferenciación (raíz) o de la dediferenciación (callo). Si las diferencias en fosforilación fueran la causa de la regulación de la expresión del genoma, podría pensarse que la menor cantidad de fosforilaciones en las muestras de callo harían a las proteínas menos afines a la cromatina (complejo DNA-histonas), y por ello no se expresarían funciones de diferenciación, o se expresarían funciones de manera no diferencial que produciría un tejido como el callo.

En resumen, las proteínas cromosomales no histónicas de embrión raíz y callo de trigo, comparten características generales, con otras PCNH de animales y plantas; como la existencia de dos poblaciones en columnas de Sephadex y gradientes de sacarosa, su composición de aminoácidos (baja o nula concentración de aminoácidos sulfurados, y el alto índice de relación de aminoácidos ácidos/básicos), y la alta tasa de fosforilaciones. Por otra parte se encontró que en general las proteínas cromosomales no histónicas de embrión difieren en composición de aminoácidos, y perfiles de elución de columnas de DEAE-celulosa (características iónicas) de las proteínas de raíz y callo, confirmando ciertos datos que las hacen similares bioquímicamente (58, 59). Por otra parte la cantidad de fosforilaciones es igual en el caso de los tejidos diferenciados (embrión y raíz), mientras que en el tejido no diferenciado (callo) la cantidad de fosforilaciones es mucho menor; esto podría indicar una relación entre las fosforilaciones de estas proteínas, y los procesos de diferenciación y dediferenciación.



## V RESUMEN

Los mecanismos de diferenciación en los organismos eucariotes, tiene su origen en la regulación de la expresión del DNA. El DNA en estos organismos esta organizado en superestructuras llamadas cromosomas; estos estan ~~compuestos~~ -además del DNA- de histonas (proteínas básicas) y no histonas (proteínas en su mayoría ácidas). A estas últimas se les ha involucrado en los mecanismos de regulación de la expresión genética. Mientras las histonas son pocas especies y algunas de ellas con una impresionante conservación evolutiva, las PCNH (Proteínas Cromosomales no Histónicas), comprenden muchas especies en un solo tejido; y varían no solo de especie a especie, sino aún entre tejidos diferenciados de un mismo organismo.

En plantas han sido estudiadas con menos amplitud que en animales, sin embargo se les ha involucrado en mecanismos de diferenciación. Sin embargo se conocen poco sus cambios durante procesos como germinación y sobre todo la formación de callosidades (tejido vegetal no diferenciado aveces formado y mantenido en un medio con sales, vitaminas y una fuente de nitrógeno y carbono, así como un balance de dos tipos de hormonas vegetales: una auxina y una citoquinina).

En este trabajo se estudiaron algunas características de estas proteínas en tres tejidos: embrión, raíz y callo, estos dos últimos provienen del primero, así que la influencia del medio externo induce la producción de un tejido diferenciado -raíz- y uno no diferenciado -callo-.

En primer lugar se separaron las proteínas en dos poblaciones gruesas, usando columnas de Sephadex G-100 y gradientes de sacarosa. Se obtuvieron dos poblaciones de proteínas, una de alto y otra de bajo peso molecular. En seguida se analizó su contenido en aminoácidos,

y se encontró que la proporción de aminoácidos ácidos/básicos es de 1.8, lo que confirma sus propiedades ácidas; por otra parte se encontró que al igual que en otros organismos, los aminoácidos sulfurados están en concentraciones bajas, o no se encuentran. En general la composición de aminoácidos entre las muestras de raíz y callo son similares, mientras que la de embrión difiere significativamente de las muestras antes mencionadas.

Según el análisis electroforético, hay pocos cambios aparentes en las especies moleculares entre muestras de embrión, callo y raíz; aunque esto bien podría indicar que las poblaciones de diferentes pesos moleculares son las mismas y que hay cambios reales en poblaciones individuales de polipéptidos, como parece indicar el análisis de aminoácidos. Hay en estas poblaciones sin embargo proteínas de alto peso molecular en la muestra de callo, que no aparecen ni en embrión ni en muestras de la raíz.

Cuando se analizaron los patrones de elución en columnas de DEAE-Celulosa, se encontraron diferencias entre las muestras, siendo las diferencias entre raíz y embrión menores que entre estas dos y callo. Estas diferencias muestran diferencias en sus propiedades iónicas; por ello se llevaron a cabo análisis en la cantidad de fosforilaciones.

Los resultados mostraron que mientras las muestras de embrión y raíz tienen 4 fosfatos por 100 aminoácidos, las muestras de callo tienen solamente 2,5 fosfatos por 100 aminoácidos.

Esto nos hace concluir que las Proteínas Cromosomales no Histónicas de estos tres tejidos, comparten características generales con las de otros organismos. Sus diferencias no son muy grandes entre sí, siendo raíz y callo más cercanos que estos de embrión.

Por otra parte es muy sugestivo que siendo las fosforilaciones uno de los mecanismos propuestos para explicar el mecanismo de acción de estas proteínas es precisamente aquí en donde las diferencias son marcadas entre tejidos "diferenciados" (embrión y raíz) y callosidades (tejido "no diferenciado"). Esto quizá es una indicación de que efectivamente las fosforilaciones modifican a las Proteínas Cromosomales No Histónicas que a su vez cambian su afinidad por la cromatina, y de esta manera actúan sobre la expresión genética.

VI BIBLIOGRAFIA

- 1.- Axel.,R, Melchior, W., Soller-Webb, B. Fenselfeld. (1974)  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71 : 5057-4105
- 2.- Paul, J., Gilmour, R.S. (1968)  
J. Mol. Biol. 34 : 305-316
- 3.- Barrett, T., D. Maryanka, P.H. Hamlyn, y H.J., Gould (1974)  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71 : 5057-5061
- 4.- Bonner J., and W.T. Garrard (1974)  
Life SCI 14 : 209-221
- 5.- Sahasrabunddhe C.G., K.E. Van Holde (1974)  
J. Biol. Chem. 249 : 152-156
- 6.-Freifelder J. (1977)  
Nature 236 : 421
- 7.- Crick F.H.C. (1971)  
Nature 234 : 25-27
- 8.- Olins A.L., D.E. Olins (1974)  
Science 183 : 330-332
- 9.- Elgin S.C.R., y H. Weintraub (1975)  
Ann. Rev. Biochem. 44 : 725-774
- 10.-Bekhor I.L., Anne J., J. N. Lapeyre y R. Stambaugh (1974)  
Arch. Biochem. Biophys. 151 : 11-19
- 11.-Yadaw S.P. (1976)  
Planta 129 : 87-89
- 12.-Spiegel S., R.L. Obendorf, A. Marcus (1975)  
Plant Physiology 56 : 502-507
- 13.-Jendrisson J., W.M. Becker (1973)  
Biochem. Biophys. Acta 319 : 48-52
- 14.-Brandt W.F. y C.Von Holt (1975)  
FEBS Lett 21 : 84-87
- 15.-Yadaw S.P., H.K. Das (1974)  
Dev. Biol. 36 : 183-186
- 16.-In vitro culture of higher plants. R.L.M. Pierik (1980)  
Kniphorst Scientific Bookshop (Wageningen, The Netherlands)
- 17.-Biochemistry of Plant Hormons. T.M. Moore (1973)  
Ac. Press (New York, San Francisco, London)

- 18.- Bonner J., G.R. Chalkey, M. Dahmus, D. Frambrough, F. Fujimura, R.C. Huang, J. Huberman, R. Jensen, K. Marushige, H. Ohlenbush, B. Oliver y J. Wilhelm. (1968)  
In Methods in enzymology. Vol XII. Parte B, Editado por: L. Grossman y K. Moldave. Academic Press, New York pp. 3-65
- 19.- Bonner J., M.E. Dahmus, D. Frambrough, R.C. Huang, K. Marushige y D.Y. Huang. (1968)  
Science 159 : 47-56
- 20.- Nagl W. (1976)  
Ann. Rev. Plant Physiol. 27 : 39-69
- 21.- Javaherian K., Amini S. (1977)  
Biochim. Biophys. Acta 478 : 295-304
- 22.- Stein G.S., T.C. Spelsberg y L.S. Kleinshmith (1974)  
Science 183 ; 817-824
- 23.- Peterson J.L., y E.H. McConkey (1976)  
J. Biol. Chem. 251 ; 548-554
- 24.- Paul J., y R.S. Gilmour (1968)  
J. Mol. Biol. 34 : 305-316
- 25.- Pederson T., y U.S. Bhorjee (1975)  
Biochemistry 14 : 3238-3242
- 26.- Cave N.D. (1968)  
Chromosoma 25 : 392-401
- 27.- Acidic Proteins of the Nucleus (1974)  
Ed. por Juan G. Cameron. Academic Press ( New York, San Francisco, London)
- 28.- Kleinshmith L.J. (1975)  
J. Cell Physiol. 85 : 459-476
- 29.- Kleinshmith L.J. (1975)  
J. Cell Biol 52 : 308-315
- 30.- Trewavas A. (1975)  
Ann. Rev. Plant Physiol. 45 : 234-280
- 31.- Mc Mahon D. (1974)  
Science 185 : 1012-1021
- 32.- Frenster J.H. (1965)  
Nature 206 : 680-683

- 33.- Holt Th. K.H., (1971)  
Chromosoma 32 : 428-435
- 34.- Travers A. (1974)  
Cell 3 : 97-104
- 35.- Spelsberg T.C., Sarkissian D., (1970)  
Phytochemistry 7 ; 1385-1391
- 36.- Pipkin J.L., D.A. Larson (1973)  
Exp. Cell Res. 79 ; 28-42
- 37.- Matsumoto H., D. Gregor, y Reinert (1975)  
Phytochemistry 14 ; 41-47
- 38.- Towill L.E., y L.F. Noodén (1975)  
Plant and cell phisiol. 16 : 1073-1084
- 39.- Yoshida H., S. Kimiko (1977)  
Plant Phisiology 59 : 497-501
- 40.- Mischke B.G., Ward O.G. (1975)  
Can. J. Biochem. 53 : 91-95
- 41.- Van Loon L.C., A. Trewawas, K.S.R. Chapman (1975)  
Plant Phisiology 55 : 288-292
- 42.- Sasaki K., (1978)  
Phisiol. Plant 42 : 257-260
- 43.- Yasuda T., Yamada Y. (1972)  
Biochem. and Biophys. Res. Comm 40 : 649-653
- 44.- Chapman K.S., Trewawas A., Van Loon L.C. (1975)  
Plant Phisiology 55 : 293-296
- 45.- Teng C.S., C.T. Teng y V.G. Allfrey (1971)  
J. Biol. Chem 246 : 3597-3509
- 46.- Key J.L., E.M. Lin, C.Y. Giffors, R. Dengler (1966)  
Bot. Gaz. 127 : 87-94
- 47.- Teissore M., R.B. Penon, Y. Van Huystee, J. Azou y J. Ricard (1975)  
Biochem. Biophys. Acta 402 : 391-402
- 48.- Murray M.G., J. Rey (1978)  
Plant Phisiology 61 ; 190-198
- 49.- Sasaki K. (1978)  
Phisiol. Plantarum 42 : 257-260

- 50.- Hiroshawa E., Takabushy E., Matsumoto H. (1978)  
Plant And Cell Phiosiology 19 : 1095-1098
- 51.- Lowry O., N. Rozenbrough, A. Farr y A. Randall (1953)  
J. Biol. Chem. 193 : 265-275
- 52.- Martin R.G., y N.A. Ames (1961)  
J. Biol. Chem. 13 : 346-349
- 53.- Frambroug D.M. y W Bonner (1969)  
Biochim. Biophys. Acta 175 : 113-122
- 54.- Fiske D., y G. SubaRow (1926)  
J. Biol Chem. 13 : 346-349
- 55.- Zink M.W. , y I.A. Veliky (1977)  
Can. J. Botany 55 : 1557-1568
- 56.- Fambrough J.R. (1969) Nuclear Protein Fractions.  
Ed. por A. Lima-de-Faria. Wiley Interscience.
- 57.- Maizel j.v. (1964)  
Annals N.Y. Acad. Sci. 121 : 382-390
- 58.- García J.A. (1977)  
Tesis Profesional (Fac. de Química UNAM)
- 59.- Loyola V.M. (1979)  
Datos no publicados.
- 60.-