

3
29

00562



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**FACULTAD DE QUIMICA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

FOSFORILACION IN VITRO DE RIBOSOMAS DE MAIZ.

**CARACTERISTICAS DE LA ACTIVIDAD DE
PROTEINA CINASA**

**TESIS CON
FALTA DE...**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICAS
(BIOQUIMICA)**

P R E S E N T A :

BIOL. GABRIELA SEPULVEDA JIMENEZ

México, D. F.

1992



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.

CONTENIDO

	PAG
ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN.....	3
INTRODUCCION.....	4
HIPOTESIS.....	6
OBJETIVOS.....	6
ANTECEDENTES.....	7
1.Características generales de las reacciones de fosforilación y desfosforilación de las proteínas.....	7
2.Significado biológico de la fosforilación de proteínas.....	8
3.Proteínas cinasas en plantas.....	18
4.Proteínas fosfatasa en plantas.....	35
5.La fosforilación de las proteínas ribosomales.....	37
MATERIALES Y METODOS.....	43
1. Materiales.....	43
1.1 Material biológico.....	43

1.2	Reactivos.....	43
1.3	Equipo.....	45
2.	Métodos.....	45
2.1	Extracción de ribosomas.....	46
2.2	Electroforesis en primera dimensión.....	46
2.2.1	Obtención de proteínas y preparación de la muestra para análisis en electroforesis.....	46
2.2.2	Preparación de geles.....	48
2.2.3	Condiciones de corrida.....	49
2.2.4	Tinción y secado de geles.....	50
2.2.5	Autorradiografía.....	50
2.3	Fraccionamiento de ribosomas por el tratamiento con concentraciones altas de sales.....	50
2.4	Cromatografía en Sefacril S-200.....	51
2.4.1	Preparación de la columna.....	51
2.4.2	Patrón de elución de marcadores de peso molecular.....	53
2.4.3	Elución de la muestra.....	53
2.5	Cromatografía en DEAE-celulosa.....	55
2.5.1	Lavado y activación de la resina.....	55
2.5.2	Elución de la muestra.....	55
2.6	Ensayo de actividad de proteína cinasa.....	56
2.7	Ensayo de actividad de fosfatasa.....	58
2.8	Ensayo de actividad de proteína fosfatasa.....	58

RESULTADOS.....	60
1. Localización de actividad de proteína cinasa en ribosomas..	60
2. Requerimientos para la fosforilación de las proteínas ribosomales.....	63
3. Fraccionamiento de los ribosomas por el tratamiento con concentraciones altas de sales.....	70
4. Requerimientos de la actividad de proteína cinasa de la fracción obtenida con el tratamiento de los ribosomas con KCl 1.5 M.....	71
5. Purificación parcial de la actividad de proteína cinasa de la fracción obtenida tratando a los ribosomas con KCl 1.5 M.....	79
5.1 Elución en Sefacril S-200.....	79
5.2 Elución por DEAE-celulosa.....	84
6. Características de la actividad de proteína cinasa eluida de la columna de Sefacril S-200.....	87
7. Actividad de fosfatasa.....	91
8. Actividad de proteína fosfatasa.....	97
DISCUSION.....	101
CONCLUSIONES.....	112
SUGERENCIAS PARA TRABAJOS FUTUROS.....	114
BIBLIOGRAFIA.....	115

ABREVIATURAS

Abl	Homólogo celular del producto del oncogene de la leucemia de Abelson
ADN	Acido desoxirribonucleico
ADP	Adenosín difosfato
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
ARN	Acido ribonucleico
mARN	Acido ribonucleico mensajero
tARN	Acido ribonucleico de transferencia
ATP	Adenosín trifosfato
C	Caseína
CaM	Calmodulina
cdc	Gene del ciclo de división celular
cpm	Cuentas por minuto
DEAE-celulosa	Dietilaminoetil celulosa
DAG	Diacilglicerol
D.O	Densidad óptica
EF-Tu, EF-G	Factores de elongación Tu y G de la síntesis de proteínas
EGTA	Acido etilenobis (oxietilenonitrilo) tetraacético
GDP	Guanosín difosfato
cgMP	Guanosín difosfato cíclico
GTP	Guanosín trifosfato
H	Histona
Hepes	N-2-hidroxietilpiperazina-N-ácido etanosulfónico
IF-2	Factor 2 de iniciación de la síntesis de proteínas
IP ₃	Inositol trifosfato
Kd	Kilodalton
Km	Constante de Michaelis-Menten
L7/L12	Proteínas ácidas de ribosomas de <i>Escherichia coli</i>
Mos	Homólogo celular del producto del oncogene del virus del sarcoma de Moloney
NAD	Dinucleótido de adenina y nicotinamida
N.D	No determinado
nm	Nanómetro

PMSF	Fluoruro de fenil, metil, sulfónilo
POPOP	{2,2-p-fenil bis (5-feniloxazol)}
PPO	2,5-difeniloxazol
Put	Putrescina
Raf	Homólogo celular de los productos de los oncogenes del virus del sarcoma 3611 y de la leucemia Mill Hill 2
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SNF1	Producto de la mutante del tipo silvestre "no fermentante de sacarosa"
Spd	Espermidina
Spm	Espermina
Src	Homólogo celular del producto del oncogene del virus del sarcoma de Roux
STE7	Producto de la mutante del gene tipo silvestre "estéril"
TEMED	N,N,N,N-tetrametiletlenodiamina
TMV	Virus del mosaico del tabaco
Tris	{Tri (hidroximetil) aminometano}
Vmax	Velocidad máxima

RESUMEN

Los ribosomas de ejes embrionarios de maíz, fueron utilizados para demostrar si existe actividad de proteína cinasa en los ribosomas, realizar una purificación parcial de dicha actividad y conocer algunas de sus características. Asimismo, determinar si también existe actividad de proteína fosfatasa en los ribosomas. Se encontró que los ribosomas de ejes embrionarios de maíz se autofosforilan. Esta autofosforilación es realizada por la actividad endógena de proteína cinasa de los ribosomas, la cual es debida probablemente a una(s) proteína(s) ribosomal(es), por lo que fué posible separarla de los mismos, bajo determinadas condiciones salinas.

La actividad endógena de proteína cinasa fué capaz de fosforilar *in vitro* tanto a sustratos exógenos (caseína e histonas) como endógenos (proteínas ribosomales) sin embargo, cuando la actividad se purificó parcialmente del ribosoma, mostró una mayor preferencia por usar como sustratos a los ribosomas que a la caseína o a las proteínas ribosomales libres. Asimismo, se encontró que esta actividad parece ser estimulada por magnesio y que potasio no tiene efecto. Se probó el efecto de otros cationes como calcio, zinc o la combinación de calcio y calmodulina y de policationes como espermidina y espermina. Sin embargo, debido a las dificultades que se tuvieron para obtener una preparación más pura de la enzima, hasta el momento no es posible concluir como afectan estas moléculas la actividad de la proteína cinasa.

Finalmente, los resultados también sugieren que existe actividad de proteína fosfatasa en los ribosomas de ejes embrionarios de maíz, la cual es inhibida por ortovanadato y zinc.

INTRODUCCION

Las proteínas cinasas y las proteínas fosfatasas son enzimas que catalizan la fosforilación y desfosforilación de proteínas. Esta modificación química que cambia la estructura y la funcionalidad de las proteínas es inducida como una respuesta celular a cambios hormonales, factores de crecimiento y a condiciones de estres (56,95).

Entre las múltiples proteínas que son sustratos de estas enzimas se encuentran algunas de las proteínas ribosomales, las cuales se fosforilan *in vivo* e *in vitro* tanto en células animales (126) como en vegetales (12,39,84,107). La fosforilación *in vitro* puede ser realizada por una variedad amplia de proteínas cinasas dependientes de CAMP, por la proteína cinasa C, la cinasa II activada por proteasas y la fosfotransferasa de la histona H4 (48,66,124). En vista de lo anterior, se ha tratado de purificar e identificar a proteínas cinasas ya sea asociadas a los ribosomas o del citosol, que fosforilen con una mayor especificidad a las proteínas ribosomales. Asimismo, tanto en células animales como en vegetales, se ha sugerido la existencia de una actividad endógena de los ribosomas, que permanece en los mismos, aún cuando han sido lavados con fuerzas iónicas altas (por ejemplo: con KCl de 0.5 a 1.0M). Sin embargo, no se conoce el origen y la función de esta actividad (3,12,51).

Entre las proteínas ribosomales que mejor se conoce que se fosforilan, están las proteínas ácidas (L7/L12) y la S6 (68,79,124). En relación con esta última, ya se han purificado del

citosol de células 3T3 y de huevos de *Xenopus* a proteínas cinasas que muestran en un ensayo *in vitro* una mayor especificidad por S6. En ambos tipos celulares, los sitios de S6 que se fosforilan *in vitro* (con la enzima purificada) son los mismos que se fosforilan *in vivo*, lo cual ha llevado a sugerir que se trata de la misma enzima (32,48).

En relación con plantas, los escasos estudios han mostrado que la fosforilación *in vitro* de las proteínas ribosomales de chícharo, de *Lemna minor* y de los cotiledones de soya puede ser realizada por proteínas cinasas que se encuentran asociadas a los ribosomas (39,48) y las de germen de trigo por proteínas cinasas del citoplasma que pueden provenir del mismo origen o bien por enzimas heterólogas provenientes de levadura y de cerebro de rata (12,109).

Por otra parte, se sabe que algunas fitohormonas como las auxinas y las citocininas estimulan la fosforilación *in vivo* de las proteínas ribosomales de los ejes embrionarios de maíz y de cotiledones de calabacita (83,127). Sin embargo, no se conoce a las enzimas que realizan dicha fosforilación por lo que para el presente estudio se planteó la siguiente hipótesis de trabajo.

HIPOTESIS DE TRABAJO

Algunas de las proteínas ribosomales de ejes embrionarios de maíz se fosforilan por medio de una(s) proteína (s) cinasa(s) específica presente en los mismos ribosomas. Esta proteína cinasa es a su vez una proteína estructural del ribosoma. El proceso es de recambio rápido por lo que debe existir además una proteína fosfatasa capaz de revertir dicha fosforilación.

OBJETIVOS

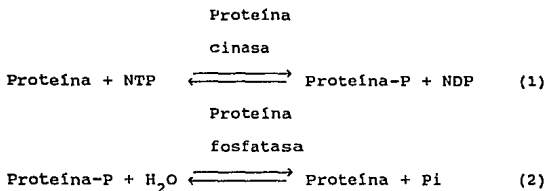
Para demostrar la hipótesis antes expuesta se plantearon los siguientes objetivos:

- 1) Demostrar la existencia de actividad de proteína cinasa en las proteínas de los ribosomas de ejes embrionarios de maíz.
- 2) Realizar una purificación parcial de la proteína cinasa de ribosomas para conocer algunas de sus características (requerimientos y especificidad de sustratos).
- 3) Demostrar si existe actividad de proteína fosfatasa en ribosomas de ejes embrionarios de maíz.

ANTECEDENTES

1. Características generales de las reacciones de fosforilación y desfosforilación de proteínas.

La fosforilación y desfosforilación de proteínas son reacciones que generan modificaciones covalentes reversibles en las proteínas y que modifican su estructura y función. Estas reacciones que se muestran en las ecuaciones 1 y 2 involucran dos tipos de enzimas denominadas proteínas cinasas (E.C.2.7.1.37) y proteínas fosfatasas (E.C.3.1.3.16) (56,95).



En donde por lo general NTP es el nucleótido ATP, pero se han reportado proteínas cinasas que usan GTP (116,120), o bien que pueden usar ambos nucleótidos como donadores de grupos γ -fosfato terminal dando un patrón de fosforilación diferente cuando usan ATP o GTP (120). Los residuos de aminoácidos de las proteínas a los cuales se transfiere este grupo γ -fosfato son generalmente serina, treonina y tirosina, sin embargo existen algunos reportes

en que los aceptores pueden ser los residuos de histidina o de lisina (56).

El desplazamiento de las ecuaciones 1 y 2 genera cambios en las concentraciones de las formas fosforiladas y desfosforiladas de las proteínas sustrato. Esto depende del control que se ejerce sobre la reacción catalizada por la proteína cinasa, o por la proteína fosfatasa o bien por una regulación simultánea de ambas reacciones. Este control está dado por los cambios en las concentraciones de las moléculas efectoras y de sustratos protéicos presentes en el medio celular (54,56).

2. Significado biológico de la fosforilación de las proteínas.

Las proteínas cinasas y las proteínas fosfatasas son de importancia funcional como intermediarias en los mecanismos de transducción de señales en los que una señal extracelular puede integrarse celularmente para dar una respuesta celular. Las señales extracelulares pueden ser estimulatorias o inhibitorias y estan dadas por hormonas y factores de crecimiento que tienen un sitio de reconocimiento en la membrana celular (receptor). La unión hormona-receptor desencadena la liberación de segundos mensajeros como son: calcio (Ca^{+2}), diacilglicerol, (DAG), inositoltrifosfato (IP_3), adenosín monofosfato cíclico (cAMP), que son moléculas efectoras de diversas proteínas cinasas y/o proteínas fosfatasas. La activación de estas enzimas da como resultado la fosforilación de diversas proteínas regulatorias o de

enzimas específicas, cuyos cambios en su estructura y funcionalidad produce una determinada respuesta celular (18,54,75) (Fig.1).

Como se ha mencionado anteriormente, las proteínas cinasas y las proteínas fosfatasas pueden usar como sustratos a proteínas que son enzimas o proteínas sin actividad enzimática, pero que están relacionadas con funciones celulares específicas.

Muchas de las enzimas regulatorias claves del metabolismo celular son reguladas por fosforilación y desfosforilación, por lo que hasta 1982 en células animales ya se habían reportado a más de 40 enzimas que sufren esta modificación química, y en plantas (en el período comprendido de 1977 a 1990) ya se habían reportado al menos 7 enzimas que pueden ser reguladas por fosforilación y desfosforilación (55).

Actualmente, se conoce que un mismo grupo de proteínas cinasas o de proteínas fosfatasas pueden activar o inactivar enzimas de vías diferentes del metabolismo. Por ejemplo, el grupo de proteínas cinasas dependientes de cAMP pueden fosforilar activando o inactivando algunas enzimas de vías metabólicas de la glucólisis, gluconeogénesis y la síntesis de ácidos grasos de células de mamíferos (Tabla # 1) (18,54). Asimismo, la proteína fosfatasa tipo 2A es activa sobre enzimas que regulan la glucólisis, gluconeogénesis, síntesis de ácidos grasos y el rompimiento de aminoácidos aromáticos en el hígado de mamíferos (Fig.2) (18,54). Con todo esto se muestra el espectro amplio de

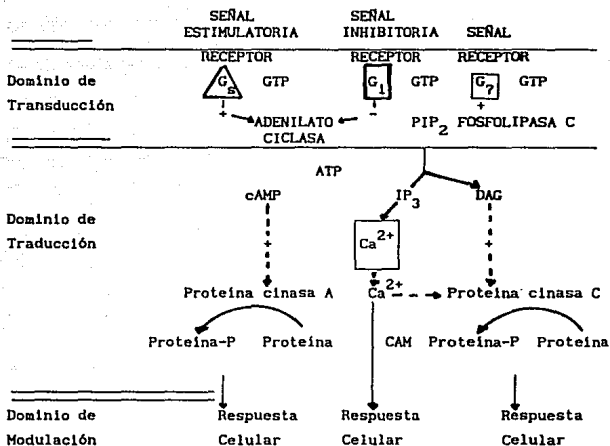


Fig.1 Representación esquemática de los sistemas de cascadas
 (Tomado de: Moolbroek y Wang, 1988).

ENZIMA	TEJIDO PRINCIPAL	VIA METABOLICA	ACTIVIDAD (A) INHIBIDA (I)
Fosforilasa cinasa	Músculo, hígado	Glucogénelisis	A
Triglicérido lipasa	Adipocitos	Lipólisis	A
Colesterol ester hidrolasa	Corteza adrenal, cuerpo luteo	Hidrólisis del colesterol	A
Fruccosa 2,6-bifosfatasa	Hígado	Glucólisis/gluconeogénesis	A
Fenilalanina hidrolasa	Hígado	Rompimiento de aminoácidos aromáticos	A
Tirosina hidrolasa	Cerebro, médula adrenal	Síntesis de catecolaminas	A
Glucógeno sintasa	Músculo, hígado	Síntesis de glucógeno	I
Acetil-CoA carboxilasa	Hígado, glándula mamaria, adipocitos	Síntesis de ácidos grasos	I
6-Fosfofructo-2-cinasa	Hígado	Glucólisis/gluconeogénesis	I
L-Piruvato-cinasa	Hígado	Glucólisis	I

TABLA # 1. ALGUNAS ENZIMAS QUE SON SUSTRATOS FISIOLÓGICOS PARA LAS PROTEÍNAS
 CINASAS DEPENDIENTES DE cAMP EN CELULAS DE MAMÍFEROS (TOMADO DE:
 COHEN, 1985)

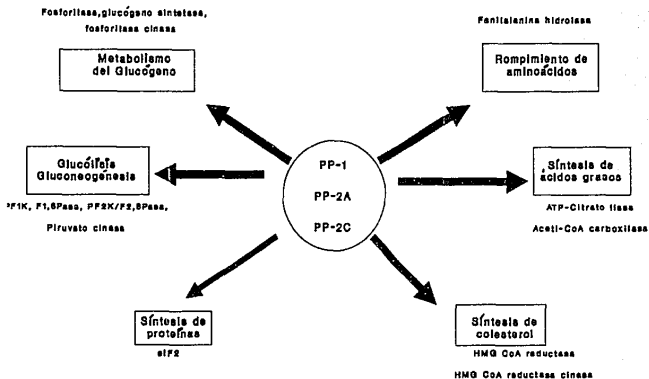


FIG 2. PAPEL POTENCIAL DE LAS PROTEINAS FOSFATAS 1, 2A Y 2C EN LA REGULACION DEL METABOLISMO. Abreviaturas: PP, proteína fosfatasa: PP1K, 6-fosfofructo-1-cinasa; F1,6PASA, fructosa 1,6 bifosfatasa; eIF2, factor de iniciación; PFK/F2, 6Pasa, 6-fosfofructo-2 cinasa/fructosa 2,6 bifosfatasa; HMG CoA, hidroximetilglutaril coenzima A. (Tomado de: Cohen, 1985).

funciones que pueden regular las proteínas cinasas y las proteínas fosfatasas y que un mismo efector (por ejemplo, el cAMP) puede desencadenar la activación o inactivación de diversas vías metabólicas. Estas a su vez pueden estar relacionadas directa o indirectamente, pero no obstante en la célula se da una integración y regulación fina de las señales extracelulares.

Por otra parte, la fosforilación y la desfosforilación de proteínas puede ser una forma de regulación de eventos celulares importantes como es el ciclo celular y la síntesis de proteínas.

En el ciclo celular, se ha identificado que el producto del gen *cdc2* de la levadura *Schizosaccharomyces pombe* es una proteína cinasa de 34 Kd de peso molecular (p 34) que es requerida para la transición de la fase G_2 a la mitosis. Esta p 34 es inactivada por fosforilación y con la unión de otra proteína llamada ciclina forma un complejo inactivo llamado factor promotor de la madurez (MPF). La activación de la p 34 requiere de una desfosforilación para fosforilar a la ciclina y formar un complejo MPF activo que promueva la transición de la fase G_2 a la de mitosis. No obstante, aunque no se han identificado con certeza a las proteínas cinasas y a las proteínas fosfatasas, ni a los residuos que realmente tienen relación con la inactivación de la p 34, es notorio que el ciclo celular involucra toda una cascada compleja de fosforilación y desfosforilación de proteínas (72,125).

La posibilidad de un control traducional por procesos de esta índole está dada por el hecho de que varios componentes de la síntesis de proteínas pueden fosforilarse y desfosforilarse. Este

es un ejemplo, en que esta modificación química puede ocurrir en proteínas sin actividad enzimática pero que pueden tener actividad regulatoria. Entre los elementos de la síntesis de proteínas que se fosforilan están algunos factores de iniciación, de elongación, aminoacil-tARN sintetasas y las proteínas ribosomales ácidas y la S6 (Tabla # 2) (46,68).

Una de las reacciones mejor caracterizadas en la que ocurre esta modificación es la del factor de iniciación eIF-2 α , cuya fosforilación se correlaciona con una inhibición de la síntesis de proteínas en un sistema *in vitro*. Las dos proteínas cinasas que la fosforilan: el inhibidor regulado por el grupo heme (HRI) y el inhibidor activado por ARN de doble cadena (DAI) son muy específicas, mientras que la fosfatasa tipo 2A que la desfosforila tiene una especificidad muy amplia (45,46). La fosforilación del factor eIF-2B se correlaciona con una síntesis de proteínas alta; sin embargo no se ha identificado a las enzimas que modifican su actividad (46).

En cuanto a los factores de elongación, eEF-2 es activado por fosforilación por una cinasa específica, la proteína cinasa III dependiente de calcio-calmodulina (43). Además, se ha demostrado que ocho aminoacil-tRNA sintetasas son fosfoproteínas; sin embargo no se ha identificado cuales el papel funcional de esta modificación química (46).

Por otra parte, se conoce que los ribosomas son estructuras formadas por ARN y proteínas lo que los hace que sean partículas funcionalmente muy cooperativas; esto implica que el modular la

PROTEINA	SUBUNIDAD	PESO MOLECULAR (Kd)	PROTEINA	SUBUNIDAD	PESO MOLECULAR (Kd)
Factores de iniciación			Factores de elongación		
eIF 1		15	<u>eEF 1</u>	<u>α</u>	51
<u>eIF 2</u>	<u>α</u>	36		<u>β</u>	48
	<u>β</u>	38		<u>γ</u>	30
	<u>γ</u>	52			
<u>eIF 2B</u>	<u>α</u>	26	<u>eEF 2</u>		95
	<u>β</u>	39			
	<u>γ</u>	58	Factor de terminación		
	<u>δ</u>	67	eRF		55
	<u>ε</u>	82			
<u>eIF 3</u>	<u>α</u>	35			
	<u>β</u>	36	Proteínas ribosomales		
	<u>γ</u>	40	<u>S6</u>		
	<u>δ</u>	44			
	<u>ε</u>	47			
	<u>ζ</u>	66			
	<u>η</u>	115			
	<u>θ</u>	170	Aminoacil-tRNA Sintetasas		
eIF 4A		46	<u>AspRS</u> ; <u>GluRS</u> ; <u>GlnRS</u> ; <u>HisRS</u> ;		
<u>eIF 4B</u>		80	<u>LysRS</u> ; <u>MetRS</u> ; <u>SerRS</u> ; <u>ThrRS</u>		
eIF 4C		18			
eIF 4D		16			
<u>eIF 4F</u>	<u>α</u>	25			
	<u>β</u>	46			
	<u>γ</u>	220			
<u>eIF 5</u>		150			

TABLA # 2. COMPONENTES PROTEICOS DE LA SINTESIS DE PROTEINAS. Las proteínas y las subunidades subrayadas son fosfoproteínas. RS: Aminoacil- tRNA sintetasa; RF: Factor de liberación. (Tomado de: Hershey, 1989).

actividad de sus componentes representaría un punto clave en los mecanismos de control que regulan la síntesis de proteínas. Por tal razón, la fosforilación de las proteínas ribosomales sería otro elemento de los mecanismos que podrían regular la actividad de los ribosomas.

La proteína ribosomal S6 de la subunidad 40S está localizada en el dominio de unión del mRNA. La fosforilación de esta proteína es inducida por agentes mitogénicos (factor de crecimiento epidérmico, insulina, suero fetal) y un aumento en su fosforilación correlaciona con una activación de la síntesis de proteínas (45,124). Entre las enzimas que fosforilan a S6 *in vitro* están las proteínas cinasas dependientes de cAMP, la cinasa II activada por proteasas, la proteína cinasa C y la fosfotransferasa de la histona H4 (33,66,123). Sin embargo aún no se ha descartado la posibilidad de que estas enzimas fosforilen a S6 *in vivo*. También se ha encontrado en las células 3T3 y en huevos de *Xenopus* a cinasas con características diferentes a las enzimas que fosforilan a S6 *in vitro*, pero que muestran una gran especificidad por S6 (32,48). En especial la cinasa de S6 de las células 3T3, parece estar regulada por un proceso de fosforilación y desfosforilación (33). En cuanto a la desfosforilación de S6 se sabe que *in vitro* puede ser realizada por proteínas fosfatasa tipo 2A y tipo 1 (46) y en huevos de *Xenopus* ya se han encontrado a dos proteínas fosfatasa, una de ellas probablemente del tipo 1 y otra no identificada que es muy específica para la proteína S6 (2).

En relación con las proteínas ácidas, estas se encuentran en la subunidad grande del ribosoma tanto de procariontes como de eucariontes y se ha mostrado que pueden tener un papel importante en la hidrólisis de GTP dependiente del factor IF-2 y en la interacción de los factores de elongación EF-Tu y EF-G con el ribosoma (59,68). El contenido de estas proteínas ácidas en ribosomas de levadura es afectado por el estado metabólico de las células. Es decir, en la etapa de crecimiento exponencial, en donde hay una síntesis activa de proteínas, hay una cantidad mayor de proteínas ácidas en los ribosomas activos que las que se encuentran en la fase estacionaria, en donde la síntesis de proteínas se lleva a cabo a una velocidad muy baja (100). Este intercambio de proteínas ácidas del citoplasma y del ribosoma es probablemente mediado por su fosforilación, ya que se ha encontrado que esta modificación aumenta su afinidad por los ribosomas (122). Recientemente, se ha confirmado que el reemplazamiento de uno de los ocho residuos de serina fosforilables por mutagénesis dirigida en la proteína ribosomal ácida YP2 β (L45) de *Saccharomyces cerevisiae*, previene su fosforilación *in vivo*, y en consecuencia, su interacción con el ribosoma, su acúmulo en el citoplasma y una reducción en la velocidad de crecimiento de las células (79).

Estos eventos muestran la relevancia de la fosforilación de las proteínas, lo cual se refleja además en la tenaz investigación que se realiza en busca de su implicación en la actividad de

proteínas que pueden ser receptores o bien que forman parte de los canales iónicos (para revisiones ver: 14,15,60,61). En forma semejante a los ejemplos que se han mencionado, se muestra a la fosforilación como un mecanismo fino de la regulación de la actividad celular.

3. Proteínas cinasas en plantas

Aproximadamente en 1956 se reconoció a la enzima fosforilasa de hígado, como la primera enzima del metabolismo del glucógeno en la que su actividad estaba regulada por un mecanismo de fosforilación y desfosforilación (55). A partir de ésta fecha, en sistemas animales se da cada vez con más frecuencia el aislamiento y purificación de proteínas cinasas importantes en sistemas animales, no solo para la fosforilación de enzimas del metabolismo del glucógeno, sino también para otras vías del metabolismo celular, por lo que Krebs (1983) propuso un sistema de clasificación de proteínas cinasas. Con base a los avances en las técnicas de la biología molecular y en las de secuenciación de proteínas, este sistema de clasificación ha sido perfeccionado por Hanks y col (1988).

El sistema de clasificación establecido por Krebs (1983) considera el residuo del aminoácido que se fosforila en la proteína sustrato y el agente regulador o efector que activa o inactiva a la proteína cinasa. De acuerdo al residuo que es fosforilado por la proteína cinasa, éstas se clasifican en dos

clases : las que fosforilan en serina y treonina y las que fosforilan exclusivamente en tirosina. Cada una de estas clases se subdivide de acuerdo al agente regulador de la enzima, por lo que la clase de proteínas cinasas de serina y treonina comprende a las proteínas cinasas dependientes de :

- a) cAMP
- b) cGMP
- c) Diacilglicerol, calcio y fosfolípidos
- d) ARN de doble cadena
- e) Acetil - CoA, NADH, piruvato, ADP
- f) Poliaminas
- g) Inhibidas por hemina
- h) No se conoce el agente regulador

En cuanto a la clase de proteínas cinasas de tirosina se subdivide en :

- a) Receptor del factor de crecimiento
- b) Receptor de insulina
- c) Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas
- d) No se conoce su agente regulador

Hanks y col (1988) además de tomar en cuenta los dos criterios usados por Krebs (1983), consideran la similitud que hay en la estructura primaria del dominio catalítico y la homología funcional. Para realizar el alineamiento de las secuencias de aminoácidos del dominio catalítico usaron secuencias de proteínas cinasas tanto de vertebrados como de invertebrados, con lo que se construyó un árbol filogenético, el cual indicó que

existía una relación entre las secuencias del dominio catalítico y algunas de las propiedades bioquímicas de las enzimas, por ejemplo: dominios catalíticos de proteínas cinasas con formas semejantes de regulación o de especificidad de sustrato, tienden a tener una estructura primaria semejante y formar grupos relacionados dentro del árbol filigenético. Considerando lo anterior Hanks y col (1988) propusieron que la familia de proteínas cinasas que fosforilan en serina y treonina se subdivide en las subfamilias de proteínas cinasas:

- a) Dependientes de nucleótidos cíclicos (CAMP y cGMP)
- b) Dependientes de calcio y de fosfolípidos
- c) Dependientes de calcio y calmodulina
- d) SNF1 (relacionadas con la gemación y la fisión de levaduras)
- e) CDC28, cdc2 (relacionadas con el ciclo celular)
- f) Caseínas cinasas
- g) Proto-oncogenes Raf - Mos
- h) STE7
- i) Otras proteínas cinasas de serina y treonina.

La familia de proteínas cinasas de tirosina comprende las subfamilias de proteínas no receptoras y receptoras:

- a) Subfamilia Src
- b) Subfamilia Abl
- c) Receptor del factor de crecimiento epidérmico
- d) Receptor de insulina
- e) Receptor del factor derivado de plaquetas
- f) Otras proteínas cinasas de tirosina semejantes a los receptores

Funcional y bioquímicamente el caracterizar a una proteína cinasa en particular, ha dado indicios para conocer el posible mecanismo de respuesta que pueden utilizar las células eucariotes ante un determinado estímulo. Este es el caso de las proteínas cinasas caracterizadas en sistemas animales y que están dentro de los sistemas de clasificación tanto de Krebs como de Hanks y col, por lo que no es extraño encontrar que dentro del campo de la bioquímica vegetal, ha habido la tendencia de buscar y caracterizar a proteínas cinasas en plantas que respondan a agentes reguladores semejantes a los encontrados en sistemas animales. Sin embargo, aunque diversos autores han realizado revisiones en relación con los avances logrados para las proteínas cinasas en plantas, aún no se ha propuesto un sistema de clasificación para las mismas. Más aún, algunos autores opinan que no es posible establecer una analogía tan fuerte con los modelos establecidos en sistemas animales, ya que las plantas, a diferencia de los animales, son organismos con limitantes de movilidad que están en mayor interacción con un ambiente que cambia constantemente; en última instancia podría haber algún equivalente en plantas que pudiera corresponder a lo establecido en sistemas animales (8,91).

Considerando lo anterior y debido probablemente a la escasa e imprecisa información que se dispone de las proteínas cinasas en plantas, en la actualidad, aún no se tiene un sistema de clasificación y no se correlacionan con exactitud con los sistemas propuestos por Hanks y col y por Krebs. Sin embargo, en esta

revisión se realizó una recopilación y un análisis de la información más relevante que se tiene en la literatura acerca de proteínas cinasas de plantas y que se resume en las Tablas 3 y 4. En la Tabla 3 se puede apreciar que se ha encontrado actividad de proteína cinasa en una gran variedad de tejidos vegetales, como son embriones de trigo y de cebada (87,88,101,102), hojas de remolacha (52,89), hipocotilos de soya (41,64), tallos de chícharo (117), y de raíces de chícharo y de maíz (17,57), asimismo de organelos como núcleo (31,63,113), mitocondria (23), cloroplasto (106), ribosoma (51,117), amiloplasto (121) y de la membrana plasmática (5,6,7,47). En la tabla 4A se puede apreciar, que de acuerdo al residuo fosforilable, se han encontrado proteínas cinasas en embriones de trigo (101), en plántulas de maíz (26,27,80), en células en cultivo en suspensión de soya (44,92) y en células de raíz de cebada (104) que fosforilan serinas y treoninas, mientras que las proteínas cinasas encontradas en amiloplastos de *Acer pseudoplatanus* (121), en núcleos de chícharo, de *Dunaliella salina* (98) y de germen de trigo (12,128) fosforilan exclusivamente serinas. En la mayor parte de los casos que se reportan en la tabla 4A, no se determinó el residuo que se fosforila.

Para el caso de las proteínas cinasas en plantas que fosforilan en tirosina, sólo existen evidencias de fosfotirosina en plántulas de chícharo (115) y recientemente se han encontrado evidencias de una clase nueva de receptores transmembranales en raíces de maíz y de *Brassica oleracea*. En ambos sistemas, se han

identificado clonas de ADN que codifican para proteínas cinasas específicas para la fosforilación de serinas y treoninas, pero que estructuralmente están relacionadas con la familia de receptores de tirosin cinasas, como es el caso del receptor del factor de crecimiento epidérmico, el cual presenta un dominio catalítico citoplásmico, unido a un dominio transmembranal y a un dominio extracelular. El dominio extracelular tanto de la proteína cinasa de maíz como la de *Brassica oleracea*, presenta homología alta con una glicoproteína involucrada con el sistema de reconocimiento entre el polen y el estigma (112,123). Todo lo anterior, indica que debido a la escasa información en relación al residuo que fosforilan las proteínas cinasas encontradas en plantas, no es posible hacer una clasificación como la propuesta para el caso de sistemas animales. Sin embargo, en la tabla 3 se muestra que de acuerdo al agente regulador se pueden distinguir varios grupos de proteínas cinasas en plantas:

- a) Independientes de cAMP
- b) Dependientes de calcio
- c) Dependientes de calcio y fosfolípidos
- d) Dependientes de calcio y calmodulina
- e) Dependientes de calcio, fosfolípidos y ésteres de forbol
- f) Dependientes de ARN de doble cadena

Un mecanismo de transducción de señales semejante al de animales mediado por los niveles de cAMP, se ha tratado de encontrar en sistemas vegetales. Sin embargo, aunque desde 1978 hasta 1987 se ha intentado aislar a proteínas cinasas dependientes

de nucleótidos cíclicos, el esfuerzo ha sido en vano y los autores han concluido por denominar a este grupo de enzimas como proteínas cinasas independientes de cAMP (Tabla # 3). En algunos de estos casos se probó el efecto de otros agentes reguladores diferentes al cAMP; por ejemplo la proteína cinasa purificada de germen de trigo por Yan y Tao (1982) no es activada por calcio, y las poliaminas a concentraciones mayores de 5mM inhibieron la actividad de la enzima. En embriones de cebada se encontró que la proteína cinasa purificada de este sistema fue inhibida tanto por calcio como por poliaminas (102). Asimismo, en la mayor parte de los casos no se ha probado el efecto de otro agente regulador, por lo que no se puede descartar la posibilidad de que se trate de proteínas cinasas que sean reguladas por otro efector diferente al cAMP.

Otro de los mecanismos de transducción de señales que se conoce en sistemas animales, es en el que una señal hormonal (por ejemplo la angiotensina y agentes adrenérgicos) generan la estimulación del ciclo del fosfatidilinositol. El rompimiento del fosfatidilinositol por la fosfolipasa C, genera inositol trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DG) que actúan como segundos mensajeros. El IP_3 genera la movilización de calcio, que activa directamente a las proteínas cinasas dependientes de calcio o bien, al unirse a proteínas como la calmodulina activa a las proteínas cinasas dependientes del complejo calcio-calmodulina. El DG por su parte activa a la proteína cinasa C, que al fosforilar

diversos sustratos induce una respuesta celular (Fig.1). Muchos de los componentes de esta vía de transducción de señales han sido encontrados en plantas tales como: el incremento del calcio intracelular inducido por estímulos ambientales (gravedad,luz) (91,36) y por hormonas vegetales (auxinas y ácido abscísico) (37,38), la presencia de calmodulina (73), de fosfolipasa C (29), ácidos grasos y ésteres de forbol (1), de fosfoinosítidos y su movilización inducida por auxinas (10,34) por lo que los bioquímicos vegetales han tratado de encontrar proteínas cinasas reguladas por calcio, calcio y calmodulina, o bien con características semejantes a la proteína cinasa C. Esta enzima de 80 Kd es activada por calcio, DG, ácidos grasos insaturados (por ejemplo: oleico y araquidónico) y por ésteres de forbol, pero es inhibida por metabolitos derivados de los esfingolípidos de membrana (como la esfingosina y los lisesfingolípidos) y por antagonistas de la calmodulina (4). En la tabla # 3 se puede apreciar, que se han purificado y caracterizado a proteínas cinasas dependientes de calcio de varios orígenes vegetales como son las células en suspensión de soya y de *Dunaliella salina* (40,44,92), hojas de remolacha (53,89), de alfalfa (9) y de chícharo (63,98). En especial, la actividad de proteína cinasa dependiente de calcio que se encontró asociada a la cromatina de chícharo parece estar involucrada en el sistema de transducción de señales que están relacionadas con la luz (98). Asimismo, la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática de raíces de cebada, parece estar regulada por un mecanismo de fosforilación mediado por

proteínas cinasas estimuladas por calcio (104).

Por otra parte, la fosforilación de proteínas de la membrana plasmática de coleoptilos de maíz (118), de tonoplasto de *Acer pseudoplatanus* (114) y de las vesículas microsomales de las raíces de maíz (130) es dependiente de un mecanismo que involucra calcio y calmodulina. Sin embargo, sólomente se han purificado y caracterizado a proteínas cinasas dependientes de calcio y calmodulina de chícharo y de germen de trigo (5,86,87). En todos los casos hasta el momento encontrados en plantas, no se conoce con exactitud a los sustratos *in vivo* de estas enzimas, ni su papel preciso en los mecanismos de transducción de señales, sólomente existe un caso en que una proteína cinasa dependiente de calcio y calmodulina modula la actividad de una enzima: la quinato NAD oxidorreductasa (94).

La proteína cinasa C es una enzima que tiene importancia en los mecanismos relacionados con la regulación del crecimiento y la diferenciación celular en sistemas animales (75), por lo cual ha sido de interés investigar si existe una enzima con propiedades semejantes en plantas. Al respecto, se aislaron dos proteínas cinasas en trigo que son activadas por ésteres de forbol y fosfolípidos (fosfatidilserina), pero que no tuvieron el peso molecular característico de la proteína cinasa C, ni las estimuló el DG (82). En calabacita también se purificó parcialmente a una proteína cinasa que es activada por calcio y fosfolípidos (103) y dos proteínas cinasas dependientes de calcio de embriones de trigo

fueron semejantes en cuanto a peso molecular, la inhibición por antagonistas de calmodulina y la activación por ácidos grasos insaturados como la proteína cinasa C, sin embargo no son activadas por fosfolípidos (52,53). Finalmente, la proteína cinasa purificada del citosol de *Amaranthus tricolor*, fue dependiente de fosfolípidos y calcio y da reacción cruzada con anticuerpos contra el área regulatoria de la proteína cinasa C de cerebro de bovino. Sin embargo, no se demostró la activación específica por ésteres de forbol que muestra la proteína cinasa C (30).

Todo esto sugiere, que en plantas pudieran existir proteínas cinasas con propiedades semejantes, pero no una enzima idéntica a la proteína cinasa C y por tanto apoya la hipótesis de que los mecanismos de transducción de señales no son idénticos en sistemas animales y vegetales. En vista de lo anterior, el grupo de Scherer (1989) ha propuesto a los lisofosfolípidos como segundos mensajeros en plantas. Estos lisofosfolípidos y ácidos grasos son generados a partir de fosfolípidos por la acción de la fosfolipasa A2 que se encuentra en la membrana plasmática. Scherer (1989) demostró la activación de esta enzima inducida por auxinas y la existencia de una proteína cinasa asociada a la membrana plasmática de hipocotilos de calabacita que es activada por calcio, lisofosfatidilcolina y lisofosfatidiletanolamina y que parece regular la actividad de la H^+ -ATPasa (74,104). Este es uno de los escasos ejemplos en la literatura, en el que un estímulo hormonal (auxinas) en plantas da la posible generación de segundos mensajeros que activan a proteínas cinasas que podrían regular la

actividad de proteínas específicas.

Las poliaminas: putrescina, espermidina y espermina son poliaminas que influyen en una gran variedad de procesos fisiológicos como son la senescencia, la división celular, la adaptación al estrés y la respuesta hormonal (111), sin embargo, aunque no se conoce su mecanismo de acción, algunos autores han propuesto que pueden actuar como mensajeros celulares dentro de un mecanismo que incluye la fosforilación de proteínas (8). Al respecto, se demostró que la fosforilación de las proteínas nucleares de chícharo y de las proteínas de membrana de coleoptilos de maíz fué estimulada por espermina (24,119). No obstante, en la tabla # 4 se muestra que la actividad de las proteínas cinasas que han sido purificadas de hipocotilos de soya y de embriones de cebada son inhibidas por poliaminas (64,102).

Por otra parte, la activación de proteínas cinasas dependientes de ARN de doble cadena (ds ARN), parece tener un significado biológico en las interacciones huésped-hospedero. Por ejemplo, existen evidencias de una proteína cinasa de 68 Kd de peso molecular, que se autofosforila y se activa en una forma dependiente de ds ARN exógeno o ante la infección por el virus del mosaico del tabaco en varios tejidos vegetales. Esta proteína cinasa cruza con anticuerpos contra una proteína del mismo peso molecular de células de mamíferos (21), en la que se ha demostrado que es una proteína cinasa que puede usar como sustrato al factor de iniciación 2 de células de eucariontes. La fosforilación de

SISTEMA	ORGANELO	REFERENCIA
cAMP-INDEPENDIENTES		
Germen de trigo		Yan y Tao, 1982
Germen de trigo		Rychlik, 1980
Embriones de trigo		Saluja, 1987
Plántulas de maíz		Dobrowolska, 1983
Cultivo de células de tabaco	Núcleo	Erdmann, 1982
Plántulas de soya	Núcleo	Murray, 1978
Plántulas de maíz, chícharo, soya, trigo.	Mitocondria	Danko, 1985
Hipocotilos de soya		Lin, 1980
Embriones de cebada		Sathyanarayana, 1987
Tallos de chícharo y <i>Lemma minor</i>	Ribosomas	Keates, 1974
DEPENDIENTES DE CALCIO		
Hojas de remolacha	Membrana plasmática	Polya, 1987
Chícharo	Núcleo	Roux, 1990
<i>Dunaliella salina</i>		Guo, 1990
Células de cultivo en suspensión de soya		Harmon, 1987
Raíces de maíz	Tonoplasto y Membrana plasmática.	Ladorr, 1989
Embriones y germen de trigo		Polya, 1985
DEPENDIENTES DE CALCIO Y FOSFOLIPIDOS		
Hipocotilos de calabacita		Schafer, 1985

TABLA # 3. PROTEINAS CINASAS EN PLANTAS

SISTEMA	ORGANELO	REFERENCIA
DEPENDIENTES DE CALCIO, FOSFOLIPIDOS Y ESTERES DE FORBOL		
Cultivo de células de trigo		Olah, 1986
DEPENDIENTES DE CALCIO Y CALMODULINA		
Chicharo	Membrana	
Nodulos de soya	plasmática	Blowers, 1985
<i>Acer pseudoplatanus</i>	Núcleo	Suzuki, 1989
	Tonoplasto	Teuillers, 1985
DEPENDIENTES DE ARN de doble cadena		
Tabaco-TMV		Roth, 1990
DEPENDIENTES DE POLIAMINAS		
Chicharo	Núcleo	Datta, 1986
Coleoptilos de maíz	Membrana	
	plasmática.	Veluthambi, 1984

TABLA # 3. PROTEINAS CINASAS EN PLANTAS (CONTINUACION)

este factor se relaciona con una inhibición de la síntesis de proteína (46).

En las tabla 4 a, b y c se muestran algunas características cinéticas y fisicoquímicas de las proteínas cinasas que se han purificado y caracterizado en plantas. En la tabla 4a, se puede apreciar que existe una variedad amplia de proteínas que se han usado como sustrato, entre las más comunes están la caseína, las histonas, la fosvitina y el suero de albúmina de bovino, sin embargo la afinidad por una u otra varía de una enzima a otra y hasta el momento no se ha demostrado que alguna de estas proteínas sea el sustrato que es usado *in vivo* por las proteínas cinasas. En la misma tabla, también se muestra que el peso molecular varía de un rango de 20 a 100 Kd. En la tabla 4b se puede apreciar que el pH óptimo varía entre 6.5 a 10. En la misma tabla también se muestra que en la mayor parte de los casos el donador del grupo γ -fosfato es el ATP, con una Km que varía en un rango de 1 a 200 μ M. Existen algunos casos en los que se demostró, que la proteína cinasa además de usar ATP también puede usar GTP aunque con una menor afinidad; por ejemplo la proteína cinasa purificada por Harmon (1987) de células de cultivo en suspensión de soya, puede usar ATP con una Km de 8 μ M y GTP con una Km de 77 μ M. Finalmente, en la tabla 4c se puede apreciar que se probó el efecto de cationes divalentes como el calcio, mercurio, cadmio, cobre, zinc así como el de diversas sales como son cloruro de potasio (KCl), cloruro de sodio (NaCl), fosfato monoácido de

REFERENCIA	SUSTRATOS	AMINOACIDO QUE FOSFORILA	PESO MOLECULAR (Kd)
Yan y Tao, 1982	C, F, sustrato-T, PRb (38, 14.8 y 12 Kd) eIF-2, eIF-3	Ser en sustrato-T	36 a 38
Rychlik, 1980	C, F, ribosomas	N.D	20
Saluja, 1987	C, F, H III, BSA, sulfato de protamina	Ser y Tre de C	100
Dobrowolska, 1983	C	S en Ser TS en Ser y Tre	S=37 y 135 TS=65
Erdmann, 1982	C, F, H III	N.D	NI=23 NII=85
Murray, 1978	C, F, proteínas de la cromatina no histónicas	N.D	55
Danko, 1985	F, C, H II y H IIIS y proteínas mitocondriales	N.D	N.D
Lin, 1980	H 1	N.D	52
Kanekatsu, 1991	H 1(HKI, HKII), HIII(HKIII)	N.D	23, 47, 28
Sathyanarayana, 1987	C, F, H III, protamina, endógeno (52 Kd)	N.D	95
Polya, 1987	BSA, C, H III.	N.D	53 y 51
Roux, 1990	H I, H IIIS, C	N.D	90
Guo, 1990	H I, péptido de mielina	Ser	40
Harmon, 1987	H IIIS, CLM.	Ser	52.2
Polya, 1985	H 1, C, F	Ser y Tre de C	K1=90 K2=86
Blowers, 1985	H, proteínas de la membrana plasmática	Ser	18

Abreviaturas: C, caseína; H, histonas; BSA, suero de albúmina de bovino; PRb, proteína ribosomal; F, fosvitina; CLM, cadena ligera de la miosina; eIF-2, 3, factores de iniciación 2 y 3; sustrato -T, proteína de germen de trigo; Ser, serina; Tre, treonina; N.D, no determinado.

TABLA # 4A. PROPIEDADES CINÉTICAS Y FÍSICOQUÍMICAS DE PROTEÍNAS CINASAS EN PLANTAS. SUSTRATOS, AMINOACIDO QUE ES FOSFORILADO Y PESO MOLECULAR.

REFERENCIA	pH Optimo	CONSTANTES CINETICAS				
		K _m		OTROS	V _{max}	
		ATP (μ M)	GTP (μ M)		ATP (μ mol/min/mg)	OTROS (μ mol/min/mg)
Yan y Tao, 1982	7. -8.5	31.0		C, 430 μ g/ml		C, 1.4 X ³ 10
Rychlik, 1980		10.0				0.215
Saluja, 1987	8.0	1.8				
Dobrowolska, 1983	7.4	20		C, 270 μ g/ml		
Erdmann, 1982	NI=8.5 NII=8.0	NI=19.3 NII=14.3		C, 24 μ M C, 30 μ M		
Murray, 1978	7.8	7.9		C, 2.4mg/ml		
Danko, 1985	7.0	200.0				
Lin, 1980	9-10.0	0.4		H1, 0.4 μ M		
Sathyanarayana, 1987		12.5				
Polya, 1987	7-9.2	PI=37 PII=20		H IIIS, 1.0mg/ml H IIIS, 0.7mg/ml		
Harmon, 1987	7-9.0	8.0	77.0	H IIIS, 0.13mg/ml CLM, 0.32mg/ml	1.7	H IIIS, 0.93 GTP, 0.5
Polya, 1985	6-7.0	16.0		C, 1.3mg/ml		

Abreviaturas: revisar tabla 4A

TABLA # 4B. PROPIEDADES CINETICAS Y FISICOQUIMICAS DE PROTEINAS
CINASAS EN PLANTAS. pH OPTIMO Y CONSTANTES CINETICAS.

REFERENCIA	EFECTO DE CATIONES		SALES QUE INHIBEN	EFECTO DE OTRAS MOLECULAS
	I	E		
Yan y Tao, 1982		Mg>Mn	NaCl, KCl	Poliaminas, ADP, GTP, GDP inhiben
Rychlik, 1980	Ca, Zn Mn	Mg	K_2HPO_4 , $(NH_4)_2SO_4$	
Murray, 1978		Mg>Mn	NaCl, NH_4Cl $(NH_4)_2SO_4$, KCl	
Danko, 1985	Ca			Calcio-calmodulina inhiben
Lin, 1980	Ca, Zn, Hg	Mg>Mn>Fe	$(NH_4)_2SO_4$, NaCl	Put<Spd<Spm inhiben
Sathyanarayana 1987	Ca, Zn			Heparina y poliaminas inhiben
Harmon, 1987	Mg		KCl	Protamina y polilisina inhiben
Polya, 1985	Co, Hg, Cd, Cu, Zn, La.	Mg+Ca	$(NH_4)_2SO_4$, KCl, K_2HPO_4 , NaCl.	Antagonistas de calmodulina y poliaminas inhiben, polilisina y poliornitina estimulan

Abreviaturas: E, Estimulan; I, Inhiben; Ca, calcio; Hg, mercurio; Zn, Zinc; Mg, magnesio; Mn, manganeso; Cu, cobre; Co, cobalto; Cd, cadmio; La, Lantano; Fe, hierro; Put, putrescina; Spd, ospermidina; Spm, espermina.

TABLA # 4c. PROPIEDADES CINETICAS Y FISICOQUIMICAS DE PROTEINAS CINASAS EN PLANTAS. EFECTO DE CATIONES, SALES Y OTRAS MOLECULAS.

potasio (K_2HPO_4) y de sulfato de amonio ($(NH_4)_2SO_4$) y se encontró que en general tienen un efecto inhibitorio en la actividad de proteína cinasa. Asimismo, también puede apreciarse en la misma tabla, que poliaminas y moléculas como el GDP, ADP pueden inhibir la actividad y que moléculas básicas como la polilisina y la poliornitina en algunos casos estimulan y en otros inhiben la actividad.

4. Proteínas fosfatasas en plantas.

Las proteínas fosfatasas de serinas y treoninas que se han purificado y caracterizado en sistemas animales, exhiben una especificidad muy amplia por sustratos, por lo que Cohen (1989) propuso una clasificación de estas enzimas basándose en el efecto que tienen diversos activadores o inhibidores, sobre la actividad de las proteínas fosfatasas. La preferencia que muestran las proteínas fosfatasas por desfosforilar la subunidad α o β de la fosforilasa cinasa permite distinguir dos tipos de enzimas, las del tipo 1 (PP1) que desfosforilan preferentemente a la subunidad α y las del tipo 2 (PP 2) que desfosforilan preferentemente a la subunidad β . Mientras que las del tipo 1 son inhibidas por concentraciones nanomolares de los inhibidores I y II de mamíferos, las del tipo 2 no son afectadas. Las PP1 no requiere de cationes divalentes para activarse, mientras que las PP2 se pueden dividir en tres grupos, las PP2A que no requieren de cationes divalentes, las PP2B que requieren de calcio y calmodulina y las

PP2C que son dependientes de magnesio. Otra característica muy distintiva que ha servido a Cohen para establecer una clasificación de las proteínas fosfatasa, es la sensibilidad que presentan estas enzimas ante el ácido okadaico y por los péptidos cíclicos llamados microcistinas. El ácido okadaico es un ácido graso poliéster producido por dinoflagelados y es causante de diarreas y promotor de tumores en mamíferos (20). Las PP1 y las PP2A son inhibidas por ácido okadaico a concentraciones de 15 nM y de 1 nM respectivamente mientras que las PP2B son muy poco sensibles y las PP2C no lo son. Por su parte, las microcistinas son hepatotoxinas producidas por cianobacterias de los géneros *Microcystis*, *Oscillatoria* y *Anabaena* y son causantes de la muerte de peces y aves. Las PP1 y las PP2A son inhibidas específicamente por las microcistinas a las mismas concentraciones utilizadas de ácido okadaico (70).

Existen otros criterios usados por Cohen para la clasificación de las proteínas fosfatasa y que se muestran en la tabla # 5. Según Cohen estos criterios se pueden usar tanto para sistemas animales como vegetales y a partir de 1989 ha mostrado evidencias de la existencia de proteínas fosfatasa tipo 1 y tipo 2A en un sistema vegetal (*Brassica napus*) (69). Asimismo ya se han aislado dos clones de ADN de *Brassica napus*, que codifican para las subunidades catalíticas de PP1 α y de PP2A α de mamíferos. Esto ha llevado a sugerir que hay un alto grado de conservación en la subunidad catalítica de las proteínas fosfatasa (71). En forma semejante Smith y Walker (1991), han aislado una clona de ADN de

maíz (ZmPP1) que codifica para una proteína cuya secuencia muestra un 80% de similitud con la subunidad catalítica de las proteínas fosfatasas tipo 1 de conejo y de levadura. Esta ZmPP1 codificó para una proteína fosfatasa del tipo 1 activa, que desfosforila a la fosforilasa α de conejo y que es fuertemente inhibida por ácido okadaico y por el inhibidor 2 de mamíferos. Estas proteínas fosfatasas son específicas para serinas y treoninas, mientras que en plántulas de trigo se purificó a una proteína fosfatasa específica para fosfotirosina (16). En la tabla # 6 se muestra el peso molecular, los sustratos que son desfosforilados y los inhibidores que afectan a la actividad de estas enzimas. Sin embargo en la mayor parte de los casos no se han probado los criterios propuestos por Cohen para clasificar a las proteínas fosfatasas encontradas en estos sistemas. Como se puede observar aún es muy escasa la información que se dispone en relación a las proteínas fosfatasas en plantas. Sin embargo, ya se han reportado que enzimas vegetales como la sacarosa fosfato sintasa, la fosfoenol piruvato carboxilasa y la quinato deshidrogenasa pueden ser sustratos de una proteína fosfatasa tipo 2A (13,108).

5. La fosforilación de las proteínas ribosomales

La fosforilación de las proteínas ribosomales ocurre tanto en células animales (126) como en vegetales (11,12,83,107,127) y puede ser realizada *in vivo* (incubando a las células con ^{32}P -ortofosfato) o *in vitro* (incubando ribosomas o sus subunidades con [^{32}P] γ - ATP y proteína cinasa). No obstante,

METODO	PP1	PP-2A	PP-2B	PP-2C
1. Preferencia por la subunidad α o β de la fosforilasa cinasa	β	α	α	α
2. Inhibición por inhibidores 1 y 2 de mamíferos	SI	No	No	No
3. Requerimiento absoluto por cationes	No	No	SI(Ca^{2+})	SI(Mg^{2+})
4. Estimulación por calmodulina	No	No	SI	No
5. Inhibición por trifluoperazina	No	No	SI	No
6. Inhibición por ácido okadalco	SI	SI	SI(débil)	No
7. Actividad de fosforilasa fosfatasa	Alta	Alta	Muy baja	Muy baja
8. Actividad para la histona H1 fosforilada por proteína cinasa C	Muy baja	Muy alta		
9. Actividad para caseína fosforilada por proteína cinasa A	Muy baja	Alta		
10. Efecto de proteínas básicas en la actividad de fosforilasa fosfatasa	Inhibición	Activación		
11. Efecto de heparina en la actividad de fosforilasa fosfatasa.	Inhibición	No hay efecto		
12. Efecto de p-nitrofenilfosfato en la actividad de fosforilasa fosfatasa.	Activación			
13. Unión a Heparin-Sefarosa a NaCl 0.1M	Retenida			

TABLA # 5 METODOS PARA DISTINGUIR ENTRE PROTEINAS FOSFATASAS
 (TOMADO DE : COHEN, 1985)

REFERENCIA	SISTEMA	SUSTRATOS	PESO MOLECULAR (Kd)	INHIBIDORES
Cohen (1989)	<i>Brassica napus</i>	Subunidades α y β de la fosforilasa	N. D	Ac.okadaico, inhibidores 1 y 2 de mamíferos
Polya (1988)	Embriones de trigo	P-HI, P-Caseína	PP1 (197) PP2 (35)	Zinc, mercurio, vanadato, NaF, ATP, molibdato y pirofosfato.
Lin (1980)	Hipocotilos de soya	P-HI, P-Caseína, Fosvitina	30	Zinc, cobalto, NaF, pirofosfato ATP, poliaminas.
Cheng y Tao (1989)	Plántulas de trigo	Sintéticos (ricos en tirosina)	35	Molibdato, ortovanadato, zinc, mercurio.
Smith y Walker (1991)	Maíz	Subunidad α de la fosforilasa	N.D	Ac.okadaico, inhibidor 2 de mamíferos

TABLA # 6 PROTEINAS FOSFATASAS EN PLANTAS

tanto en células animales como en vegetales, los patrones de fosforilación de proteínas que se observan *in vivo* e *in vitro* son diferentes ya que se ha encontrado que el número de proteínas y la cantidad de fosfato incorporado a las proteínas ribosomales *in vitro* es mayor que el encontrado *in vivo*. Por ejemplo, cuando las células de la glándula pituitaria anterior de bovino son marcadas *in vivo* se observa que preferentemente se fosforila una componente proteico, mientras que *in vitro* se encontró la fosforilación de por lo menos seis proteínas (3). Resultados semejantes fueron obtenidos para la fosforilación *in vivo* e *in vitro* de las proteínas ribosomales de hígado de rata (28). En chicharo y *Lemna minor* la fosforilación *in vivo* mostró que un 80 % de la radioactividad se une a una sola banda proteica, mientras que *in vitro* se reparte en por lo menos ocho componentes del ribosoma (117).

Lo anterior sugiere, que la(s) proteína(s) cinasa (s) *in vitro* pueden mostrar una menor especificidad para sustratos que la que tienen *in vivo*, o bien que durante el aislamiento de los ribosomas para realizar la fosforilación *in vitro* ocurre un cambio conformacional de los mismos, lo que hace que se expongan otros sitios a los cuales no tenía acceso la enzima *in vivo*. Esto puede estar relacionado con las concentraciones de potasio y magnesio del sistema de aislamiento, ya que son cationes importantes para mantener la estructura del ribosoma (62,80). En cuanto a las enzimas que catalizan la fosforilación *in vitro* de las proteínas ribosomales, se conoce que en células animales es realizada por

proteína cinasas dependientes de cAMP, por la proteína cinasa activada por proteasas, la proteína cinasa C y por la fosfotransferasa de la histona H4 (66,124). En un intento por purificar a las enzimas que catalizan la fosforilación de las proteínas ribosomales, éstas han sido aisladas tanto del citosol como asociadas a los ribosomas, en este último caso la actividad de proteína cinasa puede ser separada de los ribosomas cuando éstos se tratan con amortiguadores con fuerzas iónicas altas, por ejemplo con KCl 0.5 a 1.0 M (3,51). No obstante, en muchos de los casos a pesar de este tratamiento se ha encontrado que permanece hasta en un 50 % de la actividad unida al ribosoma, lo que ha llevado a sugerir que existe una actividad endógena de proteína cinasa en el ribosoma (3, 51). Esta actividad endógena en ribosomas de germen de trigo llega a desaparecer cuando los ribosomas se tratan a 70°C por 10 min (12).

En cuanto a la especificidad de las proteínas cinasas que fosforilan a las proteínas ribosomales, se conoce que las proteínas cinasas que se han purificado de las células de 3T3 y de huevos de *Xenopus*, muestran una gran especificidad por la proteína ribosomal S6 (32,48). Asimismo, una proteína cinasa aislada de los ribosomas de cotiledones de soya (CKII), mostró una mayor preferencia por las proteínas ribosomales que por otros sustratos (39). Sin embargo, otra proteína cinasa (CKI) aislada de este mismo sistema mostró, una mayor preferencia por la caseína que por las proteínas ribosomales (39). En forma semejante, la actividad que se encontró asociada a los ribosomas de chícharo y de *Lemna*

minor fosforila además de las proteínas ribosomales, a la fosvitina, a las histonas y como en el caso anterior el sustrato preferido es la caseína (51). Otros ejemplos de proteínas cinasas que fosforilan a las proteínas ribosomales pero que también han mostrado una especificidad muy amplia, se han encontrado asociadas a los ribosomas de reticulocitos de conejo y de testículos de trucha (49,117). Los casos más extremos, se han mostrado cuando proteínas cinasas de levadura son capaces de fosforilar a las proteínas ribosomales obtenidas de germen de trigo (109).

Independientemente, de que si la fosforilación de las proteínas ribosomales se realice *in vivo* o *in vitro*, se ha demostrado que los residuos que se fosforilan son los de serina y de treonina. Para el caso de la fosforilación *in vitro* no hay preferencia si se realiza por proteínas cinasas aisladas del citosol o asociadas a los ribosomas (49,120). Finalmente, las proteínas ribosomales que mejor se ha identificado como sujetos de fosforilación son las proteínas ácidas (L7/L12) y la S6 (68,124).

MATERIALES Y METODOS

1. Materiales

1.1 Material biológico

Semillas de maíz (*Zea mays* L) variedad Chalqueño fueron incubadas por 24 horas en charolas con algodón humedecido con agua a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ y en la obscuridad. Al término de este período se disectaron manualmente y se obtuvieron los ejes embrionarios que se almacenaron a -70°C hasta ser utilizados para la obtención de ribosomas.

1.2 Reactivos

Los siguientes reactivos fueron obtenidos de Sigma Chemical Company:

- [Tri (hidroximetil) aminometano] (Tris)
- (N - 2 -hidroxietilpiperazina-N-ácido etanosulfónico) (Hepes)
- (Fluoruro de fenil, metil,sulfonilo) (PMSF)
- Triton X 100
- β -glicerofosfato
- Sacarosa grado II
- Fluoruro de sodio (NaF)
- Adenosín trifosfato (ATP)
- Acrilamida
- Urea
- Azul de bromofenol

- Estuche de marcadores de peso molecular para cromatografía y para electroforesis en gel desnaturalizante.
- Ortovanadato de sodio
- Espermidina y espermina
- DEAE - celulosa (malla fina y mediana)
- Caseína desfosforilada de leche de bovino
- Mezcla de histonas tipo II - S de timo de ternera
- Calmodulina de espinaca y de corazón de bovino

Los siguientes reactivos fueron obtenidos de Merck de México:

- Acido etilenobis (oxietilenonitrilo) tetraacético (EGTA)
- β-mercaptoetanol
- p-nitrofenilfosfato
- Dodecil sulfato de sodio (SDS)
- 2,5-difeniloxazol (PFO)
- [2,2 -p -fenilen bis (5-feniloxazol)] (POPOP)
- N,N,N ,N -Tetrametiletilenodiamina (TEMED)
- Persulfato de sodio

- Membranas Centricon 10 de Amicon Company
- Sefacril S-200 de Pharmacia
- Papel de fosfocelulosa P 81 de Whatman
- Películas para radiografía clínica Cronex de Accesolab
- Juego de intensificadores de DUPONT
- Solución reveladora y fijadora de Kodak
- [γ-³²P] ATP de New Nuclear England

Todos los demás reactivos fueron de grado analítico.

1.3 Equipo

- Centrífuga Beckman J2-21, rotor JA-20
- Ultracentrífuga Beckman L7-65, rotor 75 Ti
- Ultracentrífuga Beckman TL-100, rotor TLA 100.2
- Equipo para electroforesis en placa (modelo SE500) de Hoefer Scientific Instruments
- Secador de geles (modelo 224) de BIO RAD
- Colector de fracciones (modelo 2112) de LKB
- Lámpara de luz ultravioleta (2138 UVICORD S) de LKB
- Graficador de Pharmacia Fine Chemicals
- Bomba peristáltica de BUCHLER Instruments

2. Métodos

2.1 Extracción de ribosomas

El método de extracción de ribosomas que se utilizó fué el descrito por Scharf y Nover (1982) con algunas modificaciones para tejidos embrionarios de maíz (Fig.3)

Todo el material de cristalería fué esterilizado a 15 libras por 10 min y las soluciones fueron preparadas y utilizadas bajo condiciones de esterilidad.

Los ejes embrionarios de maíz (3.5g) fueron pulverizados en un mortero con nitrógeno líquido y el polvo fué transferido a un

tubo de centrifuga (Corex de 25 ml) en donde se agregaron 10 ml de amortiguador de extracción (Tris-HCl 20 mM ph 7.8, MgCl₂ 5 mM, KCl 20 mM, PMSF 1 mM, NaF 1 mM, β-mercaptoetanol 0.5%, Triton X100 1%, sacarosa 0.25 M, β-glicerofosfato 80 mM), se agitó 10 seg en un vortex y se centrifugó a 7000g por 5 min. El sobrenadante se filtró al vacío a través de una capa de papel Miracloth, el filtrado se centrifugó a 29 000 g por 20 min. Cinco ml del sobrenadante se colocaron en 3 ml de un colchón de sacarosa (sacarosa 0.5 M, KCl 0.5 M en amortiguador de extracción sin sacarosa y KCl) y se centrifugó a 250 000 g por 3.5 h y a 4° C. Al término de este período, el sobrenadante fué decantado (sobrenadante posribosomal) y la pastilla ribosomal fué almacenada a -70° C hasta ser resuspendida en un amortiguador de Hepes-KOH 20 mM, pH 7.6.

2.2 Electroforesis en primera dimensión.

2.2.1 Obtención de proteínas y preparación de la muestra para análisis en electroforesis.

El método que se utilizó para la obtención de las proteínas ribosomales fué el descrito por Ramjoué y Gordon (1977).

Para obtener los patrones electroforéticos y de fosforilación *in vitro* de las proteínas ribosomales, a la mezcla de reacción de actividad de proteína cinasa se le agregaron 0.1 volúmenes de acetato de magnesio 1 M y 2 volúmenes de ácido acético glacial, al finalizar los períodos de incubación que se indican y se mantuvo

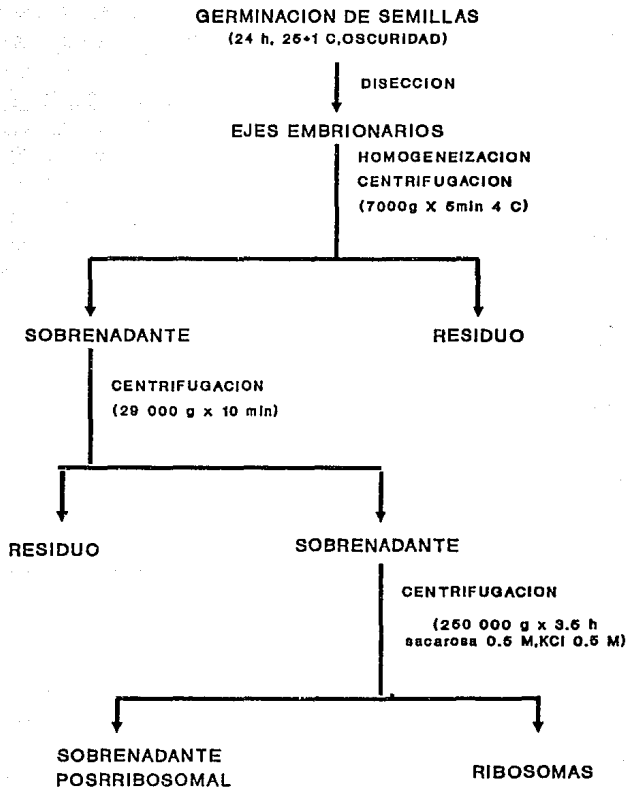


Fig.3 METODO DE EXTRACCION DE RIBOSOMAS

por 45 min en agitación continua a 4°C. Se centrifugó a 2000 rpm por 2 min en una microfuga y el sobrenadante obtenido se decantó y se guardó en hielo. El precipitado se lavó con 0.5 volúmenes de ácido acético al 67% y nuevamente se mantuvo en agitación constante por 10 min y a 4°C. Se centrifugó y el sobrenadante que se obtuvo se juntó con el sobrenadante del primer tratamiento. A estos sobrenadantes se les agregó 10 volúmenes de acetona previamente enfriada a -20°C y se incubó por un período mínimo de 2 horas a esta temperatura. Al término de este período se centrifugó a 7000g por 10 min y a 4°C, el sobrenadante se decantó y las proteínas precipitadas se resuspendieron y se lavaron nuevamente con acetona a -20°C hasta eliminar los residuos de ácido acético. Finalmente la pastilla de proteínas ribosomales que se obtuvo se secó a temperatura ambiente o 30 seg al vacío para eliminar el exceso de acetona. En estas condiciones la pastilla de proteínas ribosomales puede ser almacenada a -20°C hasta ser resuspendida en 50µl de amortiguador de muestra para electroforesis (Tris-HCl 75 mM pH 6.8, urea 8M, SDS 2.4%, glicerol 12%, β-mercaptoetanol 6%). Una vez resuspendida la muestra se calentó por 2 min en baño María y se aplicó a la placa del gel.

2.2.2 Preparación de geles

El sistema de electroforesis en geles de acrilamida con SDS que se utilizó fué el propuesto por Laemmli (1970).

Gel separador: 12.8 ml de solución I (acrilamida 30%, bisacrilamida 0.8 %) fueron mezcladas con 11.2 ml de solución II (Tris-HCl 0.75M pH 8.8, SDS 0.2%) y 11.2 μ l de TEMED, se desgasificaron por 2 min y se agregaron 80 μ l de persulfato de sodio al 20 %. La mezcla fué utilizada para formar 10 cm de gel separador de poliacrilamida con SDS al 16%.

Gel condensador: 1.16 ml de solución I fueron mezclados con 3.5 ml de solución III (Tris-HCl 0.25M pH 6.8, SDS 0.2%), 2.3 ml de agua y 7 μ l de TEMED. La mezcla se desgasificó por 2 min y seagregó 21 μ l de persulfato de sodio al 20% y fué utilizadas para formar 1 cm de gel condensador.

2.2.3 Condiciones de corrida

Las cámaras superior e inferior fueron llenadas con el mismo amortiguador de corrida (Tris-HCl 0.025 M pH 8.3, glicina 0.192 M, SDS 0.1%) y los geles fueron corridos a 80 voltios por 11 horas. El voltaje se mantuvo constante y las placas fueron enfriadas con un sistema de agua corriente.

2.2.4 Tinción y secado de geles

Al finalizar la corrida, los geles fueron fijados y teñidos en una solución de ácido acético al 7%, metanol al 50% y de azul de Coomassie al 0.2%. Después de 30 min de tinción, los geles fueron destañados con una solución de ácido acético al 7% y de

metanol al 30% por 24 horas a temperatura ambiente o bien por 3 horas a 40°C en agitación continua.

Después de desteñir los geles, estos fueron colocados en 2 capas de papel filtro y una capa de papel 3 MM y cubiertos con una capa de papel Egapac y dos de papel filtro. Los geles fueron secados al vacío por 1.5 horas en un secador de geles (BIO RAD).

2.2.5 Autorradiografía

El gel seco fué expuesto de 1 a 7 días (dependiendo de las cpm incorporadas) a una placa fotográfica y entre dos intensificadores y fué almacenada a -70°C. Posteriormente la placa fotográfica fué revelada y fijada sumergiéndola 3.5 min bajo condiciones de oscuridad, en una solución reveladora y 3.5 min en una solución fijadora de Kodak.

2.3 Fraccionamiento de ribosomas por el tratamiento con concentraciones altas de sales.

Los ribosomas (370 D.O_{280nm}) fueron resuspendidos en 4 ml de amortiguador de resuspensión (Hepes-KOH 20 mM pH 7.6), al resuspendido se le agregó 4 ml de KCl 2M y se dejó agitando toda la noche a 4°C. Al término de este período se centrifugó a 250 000g por 20min y a 4°C (centrifuga Beckman TL-100), el sobrenadante que se obtuvo (Sb1) se decantó y se guardó a -70°C hasta ser concentrado. La pastilla se resuspendió nuevamente en 2 ml de

amortiguador de resuspensión de ribosomas, se le agregó 2 ml de KCl 3M (para dar una concentración final de KCl 1.5 M) y se mantuvo en agitación continua toda la noche y a 4°C. Después de este período se centrifugó nuevamente a 250 000g por 20 min y a 4°C, el sobrenadante (Sb2) se guardó a -70°C hasta ser concentrado. La pastilla se volvió a resuspender en 2 ml de amortiguador de resuspensión, se le agregó 2 ml de LiCl 8M y se incubó toda la noche a 4°C. Al término de este período se centrifugó a 10 000 rpm por 30 min y a 4°C y el sobrenadante (Sb3) fué guardado a -70°C hasta ser concentrado.

Los sobrenadantes Sb1, Sb2, Sb3 fueron lavados del exceso de sales con amortiguador de resuspensión de ribosomas y concentrados hasta un volumen de 50 µl por ultrafiltración con membranas de Amicon 10.

Los concentrados de cada uno de los sobrenadantes fueron almacenados a -70°C hasta ser utilizados (Fig. 4).

2.4 Cromatografía en Sefacril S-200

2.4.1 Preparación de la columna.

Una columna de 1.4 cm por 60 cm empacada con Sefacril S-200 que fué lavada y equilibrada con Hepes-KOH 20 mM pH 7.6, fué utilizada para obtener el patrón de elución de proteínas de peso molecular conocido y la elución del sobrenadante obtenido al tratar a los ribosomas con KCl 1.5 M.

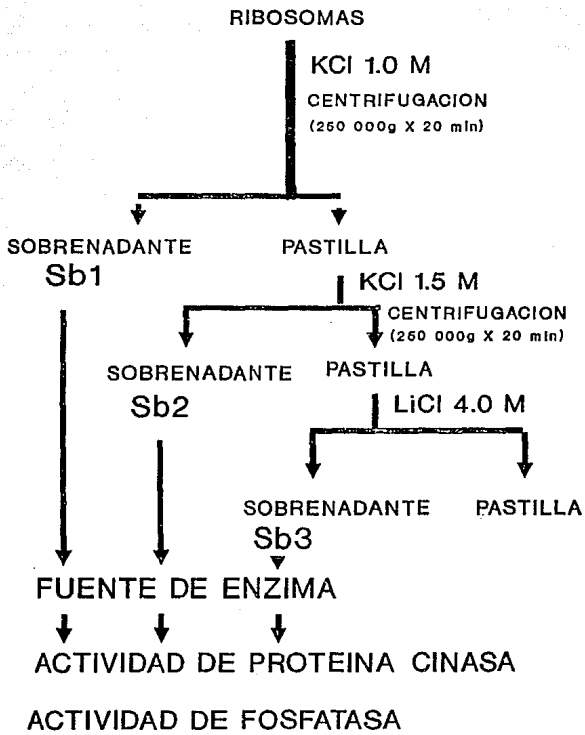


Fig.4 TRATAMIENTO SALINO DE LOS RIBOSOMAS

2.4.2 Patrón de elución de marcadores de peso molecular.

El patrón de elución y la curva de calibración de marcadores de peso molecular fué realizada con una mezcla (1mg/ml) de proteínas de peso molecular conocido: ribonucleasa A (13.7 Kd), quimotripsinógeno (25.0 Kd), ovoalbúmina (43.0 Kd) y suero de albúmina de bovino (67.0 Kd) que fueron eluidas con Hepes-KOH 20mM pH 7.6 a una velocidad de flujo de 10 ml/h. El patrón de elución de cada una de las proteínas fué monitoreado con una lámpara de luz ultravioleta y registrado en un graficador (Fig.5).

2.4.3 Elución de la muestra

Los ejes embrionarios de maíz (70g) fueron utilizados para obtener ribosomas que fueron resuspendidos en 10 ml de Hepes-KOH 20 mM pH 7.6 y se les agregó 10 ml de KCl 3.0 M (para dar una concentración de KCl 1.5 M). Esta resuspensión se dejó agitando toda la noche a 4°C. Después de este período se centrifugó a 250 000g por 20 min, el sobrenadante se decantó, se lavó del exceso de sales y se concentró hasta 1 ml por ultrafiltración por membranas de Amicon 10. Este concentrado fué eluido en la columna de Sefacril S-200 con Hepes-KOH 20 mM pH 7.6 a 4°C y a una velocidad de flujo de 10ml/h en fracciones de 2 ml.

El patrón de elución fué monitoreado por una lámpara de luz ultravioleta y espectrofotométricamente a 280 nm. Finalmente, las

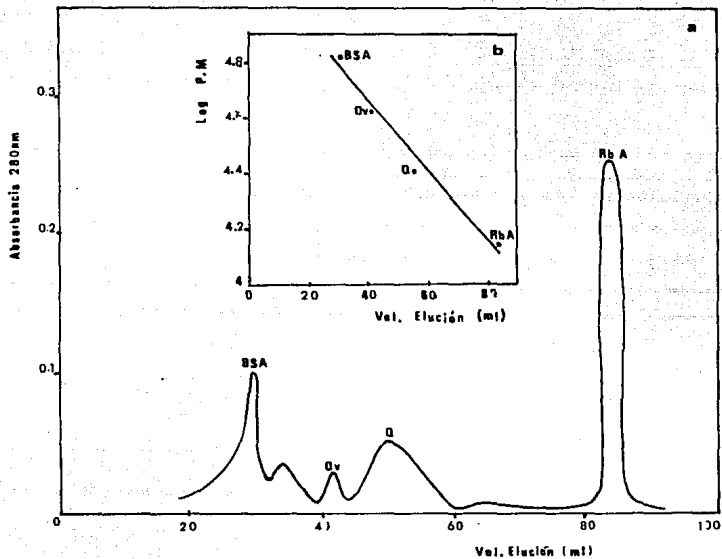


Fig 5. Elución en Sepacril S-200 de marcadores de peso molecular (P.M): suero de albúmina de bovino (BSA, 67 Kd), ovoalbúmina (Ov, 43.2 Kd), quimiotripsina (Q, 25 Kd) y ribonucleasa A (Rb A, 13.7 Kd). a) Patrón de elución. b) Curva patrón en base al logaritmo del peso molecular de los estándares.

fracciones fueron concentradas por ultrafiltración por membranas de Amicon 10. Los concentrados (50 μ l) fueron almacenados a -70° C hasta ser utilizados para medir la actividad de proteína cinasa o bien para obtener el patrón de electroforesis en geles con SDS.

2.5 Cromatografía en DEAE-celulosa.

2.5.1 Lavado y activación de la resina.

Cinco gramos de DEAE-celulosa se colocaron en 75 ml de HCl 0.5 M, se agitó suavemente durante 45. min y se lavó con agua desionizada hasta llevarla a un pH de 4.0. La resina se resuspendió en 75 ml de KOH 0.5 M, se agitó nuevamente durante 45 min a temperatura ambiente y se lavó con agua desionizada hasta llevarla a un pH de 8. Nuevamente la resina se resuspendió en 80 ml de KCl 0.05 N, se llevó a un pH de 7.2 con HCl 0.05 N y se agitó suavemente por una hora. Se rectificó el pH y se siguió agitando por dos horas. Finalmente se decantó y se eliminaron las partículas finas.

2.5.2 Elución de la muestra.

La DEAE-celulosa lavada y activada fué utilizada para empacar una columna de 1.5 cm por 13 cm. Una vez empacada la columna fué equilibrada con Hepes-KOH pH 7.6. Bajo estas condiciones, la fracción 3 obtenida del Sefacril S-200 fué eluida con amortiguador

de equilibrio y con dos gradientes de KCl, uno de 0 a 0.5 M y otro de 0.5 a 1.0 M. La velocidad de flujo fué de 18.7 ml/h. El patrón de elución fué monitoreado por espectrofotometría a 280 nm. Cada una de las fracciones fué dializada contra Hepes-KOH 20 mM pH 7.6 y concentrada hasta un volumen de 0.5 ml.

2.6 Ensayo de actividad de proteína cinasa

El método que se utilizó para medir la actividad de proteína cinasa fué el descrito por Roskoski (1983) con algunas modificaciones en la mezcla de reacción y en el número de lavados con ácido fosfórico.

La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 50 μ l: Hepes-KOH 255 mM pH 7.6, β -mercaptoetanol 0.65 mM, $Mg(CH_3COO)_2$ 0.925 mM, ATP 0.8 mM, ribosomas (0.050 D._{0.280nm}), 0.20 μ C de [γ - 32 P] ATP y H₂O para completar un volumen de 50 μ l.

Para el cálculo de las concentraciones del magnesio, ATP y del complejo ATP-Mg se utilizó el programa elaborado por Rodríguez Sotres y Muñoz-Clarés (1990). Con este programa se estableció que bajo las condiciones de ensayo, las concentraciones libres de magnesio y ATP fueron 0.190 mM y 0.050 mM respectivamente y del complejo ATP-Mg de 0.735 mM. Asimismo, este programa fue utilizado para calcular las concentraciones libres de calcio u otras de magnesio y de ATP-Mg que se indican en las tablas y figuras de resultados.

Cuando se probó el efecto de poliaminas (espermidina y/o

espemina), cationes (ortovanadato, zinc) y calmodulina, estos fueron añadidos en las concentraciones que se indican en el momento de preparar la mezcla de reacción, así como para la fosforilación de sustratos exógenos como la caseína (6mg/ml), la mezcla de histonas (2 mg/ml) u otros sustratos.

Toda la mezcla de reacción sin la fuente de enzima y el ATP fué mezclada en un vortex por 10 seg, se centrifugó por 30 seg en una microfuga y se le agregó la fuente de enzima. La reacción fué iniciada adicionando a la mezcla el [γ -³²P] ATP y se incubó a 27°C en los tiempos que se indican. Al finalizar la incubación la reacción fué terminada pipeteando alicuotas de 16 μ l sobre bandas de papel de fosfocelulosa (Whatman P 81) de 1 por 2 cm y que fueron sumergidas en ácido fosfórico 75 mM (10 ml por muestra) Cada una de las bandas fué agitada suavemente (con un agitador magnético) por 2 min, el ácido fosfórico se decantó y se adicionaron nuevamente 10 ml de ácido fosfórico, se agitó nuevamente por 2 min y se procedió a lavar las bandas de fosfocelulosa dos veces más con este procedimiento.

Después de lavar las bandas de papel de fosfocelulosa con ácido fosfórico, estas se secaron durante 3 horas a temperatura ambiente o bien durante 30 min con una lámpara de 150 Watts. La radioactividad fué medida con líquido de centelleo (4g de PPO, 0.05g de POPOP en 1 litro de tolueno) en un contador de centelleo líquido Packard.

Los blancos tuvieron el mismo tratamiento que las muestras pero a la mezcla de reacción no se le agregó la fuente de enzima.

2.7 Ensayo de actividad de fosfatasa.

El método que se utilizó para medir la actividad de fosfatasa fué el propuestó por Cheng y Tao (1989).

La mezcla de reacción contenía en un volúmen final de 1 ml: Hepes-KOH 50 mM pH 7.5, p-nitrofenilfosfato 0.8 mM, fuente de enzima (0.300 D.O_{280nm}) y H₂O hasta completar 1 ml.

Cuando se probó el efecto de los inhibidores: NaF, β -glicerofosfato, ortovanadato de sodio, ZnCl₂, molibdato de amonio, estos fueron incluidos en la mezcla de reacción para obtener las concentraciones finales que se indican.

La mezcla de reacción sin la fuente de enzima fué agitada por 10 seg en un vortex. La reacción se inició con la adición de la fuente de enzima y se incubó a 30°C. Al término de cada tiempo se leyó la liberación de p-nitrofenilo espectrofotometricamente a 410 nm.

Los blancos tuvieron el mismo tratamiento que las muestras excepto que la mezcla de reacción no contenía la fuente de enzima.

2.8 Ensayo de actividad de proteína fosfatasa.

Los ribosomas (0.8 D.O_{280nm}) fueron fosforilados, para lo cual fueron incubados por 30 min en una mezcla de ensayo de actividad de proteína cinasa. Después de este período de incubación, la reacción se terminó añadiendo a la mezcla de reacción 1 volumen de ATP (80 mM) frío. Se agitó por 30 seg en un

vortex y se centrifugó a 250 000g por 20 min (Ultracentrífuga Beckman TL-100). El sobrenadante se decantó y la pastilla de ribosomas fosforilados fue resuspendida en Hepes-KOH 50 mM pH 7.5 y se incubó a 30°C a los tiempos que se indican (0, 10, 30 y 60 min). Al finalizar cada uno de los tiempos de incubación, la reacción se terminó agregando 0.1 volúmenes de acetato de magnesio 1M y 2 volúmenes de ácido acético glacial y se siguió el procedimiento para la obtención de proteínas ribosomales, las cuales se analizaron por electroforesis en geles con SDS y la autorradiografía correspondiente. La desaparición de marca radioactiva en las bandas de proteína para cada uno de los tiempos de incubación en relación al tiempo cero, indicó la existencia de actividad de proteína fosfatasa en el sistema.

RESULTADOS

En este estudio se utilizaron ejes embrionarios de semillas de maíz (variedad Chalqueño) germinadas por 24 horas. De éste tejido embrionario se obtuvieron los ribosomas para demostrar la existencia de actividad de proteína cinasa, purificarla parcialmente y conocer algunas de sus características. Por otra parte, también se determinó si existía actividad de proteína fosfatasa de la misma fracción ribosomal.

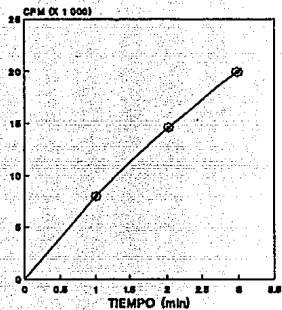
1. Localización de actividad de proteína cinasa en ribosomas.

Este estudio tuvo como primer objetivo demostrar la existencia de actividad de proteína cinasa en ribosomas de ejes embrionarios de maíz. Para esto se midió la actividad de la enzima en tres fracciones diferentes del eje embrionario: extracto crudo, sobrenadante posribosomal y fracción ribosomal. Los resultados indicaron que existía actividad de proteína cinasa en las tres fracciones probadas (Tabla # 7).

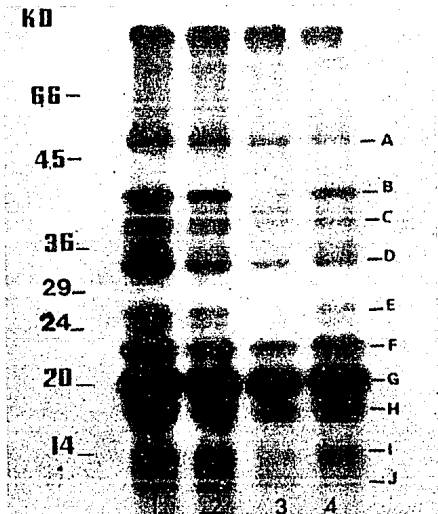
Realizando un ensayo de actividad de proteína cinasa (en ausencia de sustratos exógenos) en ribosomas lavados con KCl 0.5 M se obtuvo la cinética y el patrón de fosforilación de las proteínas ribosomales. A un tiempo de 3 min, se encontró la fosforilación en al menos diez bandas de proteína ribosomal de peso molecular aproximado de 52.5, 42.6, 38.0, 34.5, 26.3, 22.4, 20.0, 16.6, 13.8, y 12.6 Kd (Fig. 6a,b).

FRACCION CELULAR	ACTIVIDAD DE PROTEINA SUSTRATO	CINASA CPM
EXTRACTO CRUDO	HISTONAS	20 000
SOBRENADANTE POSRRIBOSOMAL	CASEINA	105 000
RIBOSOMAS	CASEINA	98 000

TABLA # 7. LOCALIZACION DE LA ACTIVIDAD DE PROTEINA CINASA EN
DIFERENTES FRACCIONES DE EJES EMBRIONARIOS



a



b

Fig. 6 Autofosforilación de ribosomas de ejes embrionarios de maíz lavados con KCl 0.5 M. a) Cinética de fosforilación. b) Autorradiografía que muestra el patrón de fosforilación de las proteínas ribosomales de peso molecular (Kd): A) 52.5; B) 42.6; C) 38.0; D) 34.5; E) 26.3; F) 22.4; G) 20.0; H) 16.6; I) 13.8; J) 12.6. Los carriles contenían: 1) 12.0, 2) 6.0, 3) 3.0 y 4) 5.0 D._{280nm} de proteína ribosomal.

Estos resultados demostraron que existe actividad endógena de proteína cinasa en ribosomas de ejes embrionarios de maíz, la cual es capaz de utilizar como sustratos a las proteínas ribosomales.

2. Requerimientos para la fosforilación de las proteínas ribosomales.

La actividad óptima de diversas proteína cinasas reportadas en la literatura ocurre en presencia de diversos efectores como pueden ser poliaminas, calcio, calmodulina, etc.

En este trabajo como un dato preliminar, se encontró que la actividad de proteína cinasa encontrada en ribosomas mostró una mayor actividad hasta los dos minutos en presencia de calcio (0.5 mM) y calmodulina de corazón de bovino (7 Unidades), o bien en presencia de las poliaminas espermidina (0.04 mM) y espermina (0.4 mM), pero también con ambos tratamientos, la actividad disminuyó a los tres minutos si se compara con el control (Fig. 7).

Estos resultados mostraron efectos contradictorios sin embargo, aunque no son concluyentes, sugieren la necesidad de obtener una preparación más pura de la enzima, lo cual permitiría definir como afectan estos efectores la actividad de la proteína cinasa.

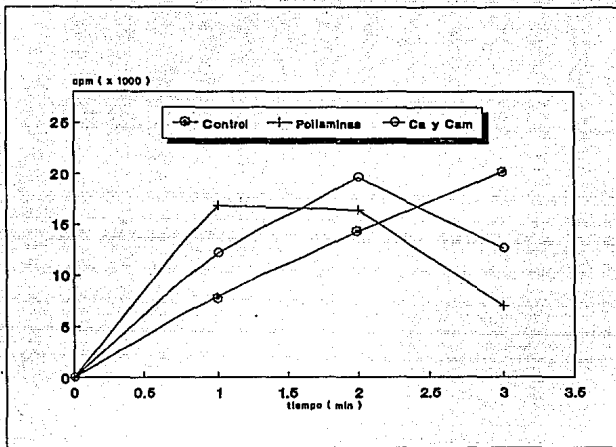


Fig.7 Actividad de proteína cinasa de ribosomas en ausencia (⊙) y en presencia de pollaminas (+) o de calcio y calmodulina (○).

No obstante, para conocer si algún cambio en la estructura del ribosoma afecta la actividad de proteína cinasa y para definir si dicha actividad es dependiente de la concentración de calcio, calmodulina y magnesio, se obtuvieron ribosomas en presencia de un agente quelante de cationes como es el EGTA (1 mM).

Los resultados mostraron que en ausencia de calcio, calmodulina y bajo las condiciones de ensayo de ATP-Mg (0.735 mM) y de magnesio libre (0.190 mM), existió actividad de proteína cinasa. El calcio (9.8 μ M), la calmodulina de corazón (50 Unidades) o una combinación de calcio y calmodulina no afectaron esta actividad. Sin embargo, magnesio libre (20.125 mM, condición en la que se mantiene constante la concentración ATP-Mg), aumentó hasta en un 360% la actividad de proteína cinasa. La combinación de calcio (9.8 μ M) y/o calmodulina (50 Unidades) con magnesio, no aumentaron la actividad que se obtuvo en presencia de magnesio libre solo en el ensayo (Fig.8). Para confirmar el efecto dado por magnesio, se probaron otras concentraciones de magnesio libre y otras combinaciones de magnesio con calcio o de magnesio con calmodulina. Los resultados confirmaron que 20.125 mM libre es la concentración óptima de magnesio. Variando la concentración de calcio libre en un rango de 9.6 a 240 μ M y manteniendo la concentración de magnesio libre a 10.125 mM, se encontró que a estas concentraciones el calcio no tuvo efecto en la actividad de la proteína cinasa si se compara con el efecto que dió el magnesio a una concentración de 10.125 mM. Asimismo, se encontró que calmodulina de corazón de bovino en un rango de 13 a 100 unidades

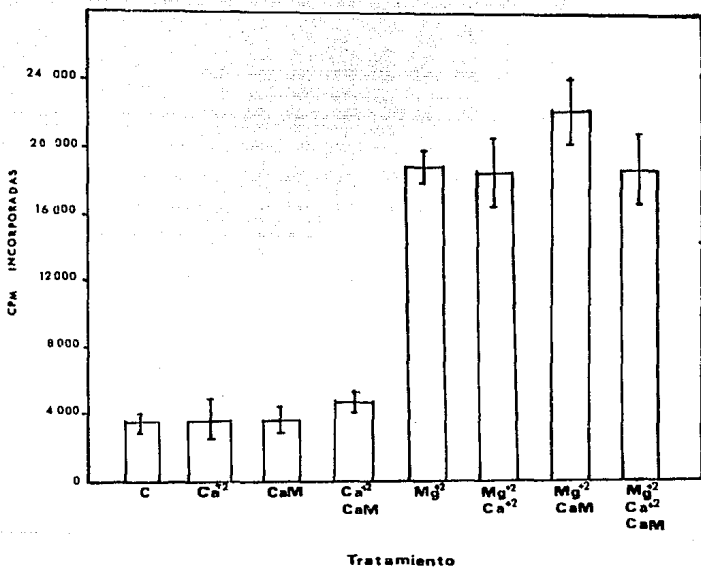


Fig.8 Actividad de proteina cinasa de ribosomas obtenidos con EGTA en presencia de: calcio libre 9.8 μM (Ca^{+2}), calmodulina 50 U (CaM), magnesio libre 20.125 mM (Mg^{+2}) o una combinaci3n de los mismos. El control (C) se realiz3 bajo las condiciones de ATP-Mg descritas en materiales y m3todos. Las concentraciones de calcio y magnesio libre fueron calculadas como se indica en materiales y m3todos

y con una concentración de magnesio de 10 mM no tuvo un efecto importante en la actividad de la enzima bajo las condiciones probadas (Fig. 9).

Analizando el patrón de fosforilación de las proteínas ribosomales de los ribosomas obtenidos con EGTA, se encontraron tanto cambios cuantitativos (o de la cantidad de fósforo radioactivo incorporado a las mismas proteínas que se fosforilan) como cualitativos (o del número de proteínas fosforiladas), dependiendo de la concentración de magnesio que se utilizó. Con magnesio 20.125 mM, hubo un aumento cuantitativo en las proteínas de 52.5, 42.6, 38.0, 34.5, 22.4, 20.0, 16.6, 13.8 y 12.6 Kd, las cuales se fosforilaron menos en presencia de la combinación de magnesio 10.125 mM con calcio (9.8 μ M) o con calmodulina de corazón (50 U). Cualitativamente, con magnesio 20.125 mM se fosforilaron dos proteínas más, de 35.2 y 26.3 Kd que no se fosforilaron con magnesio 10.125 mM en combinación con calcio y calmodulina (Fig.10).

Estos resultados indicaron que calcio y calmodulina no tuvieron efecto en la actividad de proteína cinasa de los ribosomas obtenidos en presencia de EGTA. Por el contrario, la actividad de la enzima fue dependiente de la concentración de magnesio en el sistema.

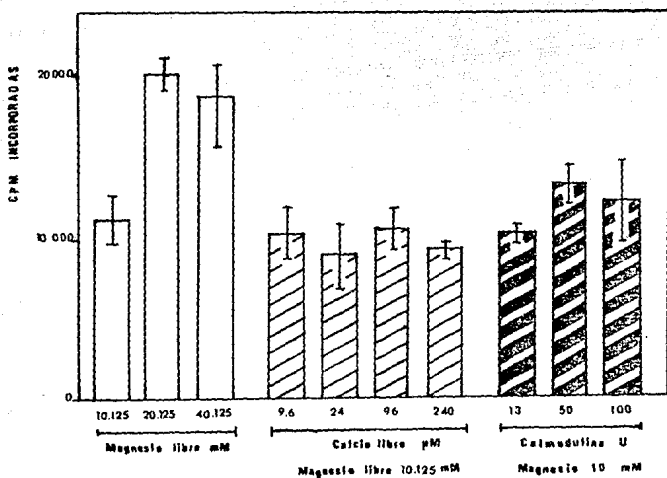


Fig. 9 Efecto de la concentración de magnesio libre y de la combinación de magnesio con calcio o de magnesio con calmodulina en la actividad de proteína cinasa de ribosomas obtenidos en presencia de EGTA. Las concentraciones de magnesio y calcio libre fueron calculadas como se indica en materiales y métodos.

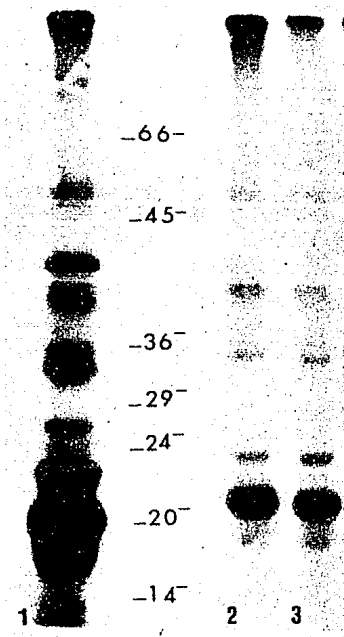


Fig. 10 Patrón de fosforilación de las proteínas ribosomales de ribosomas obtenidos con EGTA en presencia de magnesio 20.125 mM (1), o de la combinación de magnesio libre 10.125 mM con calcio libre 9.8 μ M (2) o de magnesio 10 mM con calmodulina de corazón de bovino 50 U (3).

3. Fraccionamiento de los ribosomas por el tratamiento con concentraciones altas de sales.

En vista de que los resultados anteriores, mostraron que existía actividad de proteína cinasa en los ribosomas de los ejes embrionarios de maíz, se procedió a separar esta actividad tratando a los ribosomas con concentraciones altas de sales: KCl 1.0M, KCl 1.5M y LiCl 4M. Los sobrenadantes obtenidos: Sb1, Sb2 y Sb3 respectivamente (para detalles ver Fig.4 de materiales y métodos) fueron utilizados para realizar un ensayo de actividad de proteína cinasa en ausencia y en presencia de sustratos exógenos (caseína e histonas). A los 6 min de incubación, la reacción se detuvo y se realizó las electroforesis y las autorradiografías respectivas. La placa correspondiente al Sb1 en ausencia de sustratos exógenos, mostró la fosforilación de una proteína de aproximadamente 17.2 Kd de peso molecular que permanece en el Sb1 (Fig.11 ENDO), mientras que en los Sb2 y Sb3 no se encontró la fosforilación de esta proteína, a pesar de que se encontró también una banda de proteína de este peso molecular en el patrón electroforético tanto del Sb2 como del Sb3.

La actividad obtenida en el Sb1 fue capaz de fosforilar sustratos exógenos (puestos en el ensayo) como la caseína y una mezcla de histonas. De la caseína se fosforilaron dos proteínas de aproximadamente 26.0 y 31.0 Kd y de la mezcla de histonas también se fosforilaron dos proteínas una de 17.0 y otra de 13.0 Kd. Estas mismas proteínas que se fosforilan de la caseína y de la mezcla de

histonas por la actividad del Sb1, también fueron fosforiladas por la actividad que se obtuvo en el Sb2 y el Sb3 (en este último caso solamente se utilizó la mezcla de histonas). No obstante, a pesar de igualar las condiciones de ensayo para los tres casos, la fosforilación de los sustratos exógenos fue mayor cuando se usó como fuente de enzima al Sb1 que cuando se utilizó al Sb2 o al Sb3. De aquí se concluyó que un tratamiento de los ribosomas con KCl 1.5M sería suficiente para obtener la mayor parte de la actividad de proteína cinasa del ribosoma (Fig.11).

Estos resultados mostraron que la actividad de proteína cinasa de ribosomas obtenida con el tratamiento con concentraciones altas de sales, fue capaz de fosforilar sustratos endógenos y exógenos (caseína e histona). Dicha actividad permaneció aún tratando el corazón ribosomal con LiCl 4M.

4. Requerimientos de la actividad de proteína cinasa de la fracción obtenida con el tratamiento de los ribosomas con KCl 1.5 M.

El tratamiento de los ribosomas con KCl 1.5M permitió obtener una fracción con actividad de proteína cinasa. Esta actividad aún a los 6 min, presentó una cinética lineal de fosforilación de sustratos endógenos (que permanecen en la fracción) (Fig. 12). Este tiempo fue el que se consideró para medir la velocidad de incorporación a sustratos exógenos (caseína) y ver el efecto de

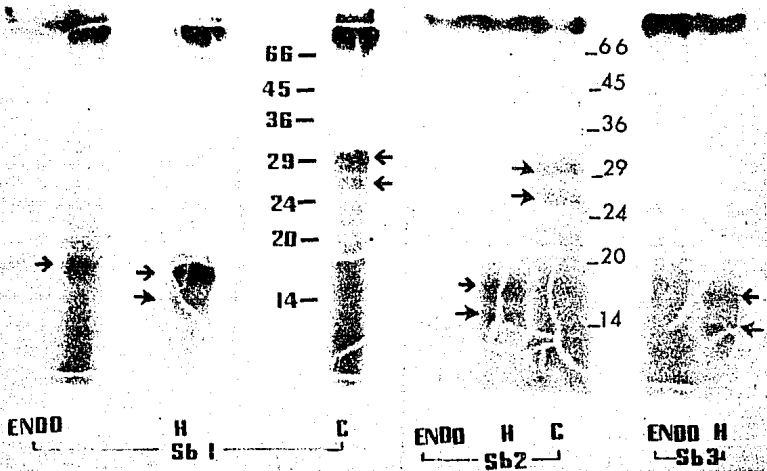


Fig. 11 Patrón de fosforilación de sustratos endógenos (ENDO) y exógenos: histona (H) y caseína(C) por la actividad de proteína cinasa de la fracción obtenida con el tratamiento de los ribosomas con KCl 1.0 M (Sb 1), KCl 1.5 M (Sb 2) y LiCl 4M (Sb 3).

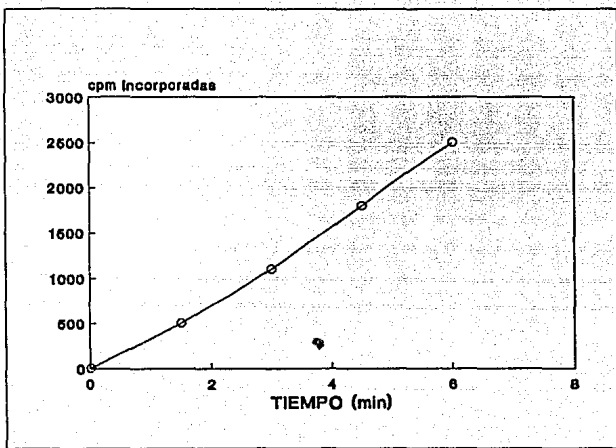


Fig.12 Cinética de fosforilación de sustratos endógenos de la fracción obtenida tratando a los ribosomas con KCl 1.5 M por la actividad de proteína cinasa obtenida en la misma fracción.

poliaminas y de algunos cationes.

Al medir la velocidad de incorporación a diferentes concentraciones de caseína (3 a 25 μM usando 25.7 Kd como peso molecular promedio de la caseína), los resultados mostraron una curva de tipo Michaelis-Menten, en la que a 20 μM ya se mostró una saturación (Fig. 13a). Al realizar un gráfico de Woolf-Augustinsson-Hofstee se obtuvo una K_m aparente de 4.49 μM con una V_{max} aparente de 0.408 pmol/ml/min (Fig.13b).

Por otra parte, se determinó el efecto de las poliaminas: espermidina y espermina, de calmodulina y de diversos cationes en la fosforilación de sustratos endógenos (que permanecen en la fracción), por la actividad de proteína cinasa obtenida en la misma fracción. Para el caso de las poliaminas, los resultados mostraron que a las concentraciones probadas, tanto la espermidina como la espermina no tuvieron un efecto considerable (Tabla # 8).

En cuanto a cationes, el calcio (20 μM libre) y una combinación de calcio (10 μM) con calmodulina de espinaca (50 Unidades), inhibieron la actividad en un 40 y 25 % respectivamente. Cabe destacar que bajo las condiciones de ensayo y para el caso del calcio, este cation tiende a formar complejos con el ATP. Por otra parte, el cloruro de zinc (ZnCl_2) a una concentración de 120 μM también la inhibió en un 47% (Tabla # 9). Mientras que ortovanadato de sodio (200 μM) y potasio a las concentraciones probadas (0.625 a 2.5 mM) no afectaron la actividad de la proteína cinasa obtenida en esta fracción (Tabla # 9 y fig.14). Finalmente, magnesio (270 μM libre) bajo las

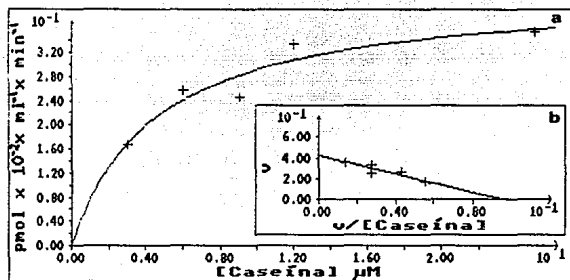


Fig. 13 Fosforilación de caseína por la actividad de proteína cinasa de la fracción obtenida con el tratamiento de los ribosomas con KCl 1.5 M.
 a) Cinética de fosforilación a diferentes concentraciones de caseína y bajo las condiciones de ensayo descritas en materiales y métodos.
 b) Gráfico de Woolf-Augustinsson-Hofstee.

TRATAMIENTO	%
CONTROL	100
Spd (μ M)	
25	114
50	103
100	108
150	81
Spm (μ M)	
25	93
50	93
100	84
150	110

TABLA # 8. EFECTO DE LAS POLIAMINAS ESPERMIDINA (Spd) Y ESPERMINA (Spm) EN LA ACTIVIDAD DE PROTEINA CINASA DE LA FRACCION OBTENIDA TRATANDO A LOS RIBOSOMAS CON KCl 1.5 M.

TRATAMIENTO	%
Control	100
Calcio libre (20 μ M)	59
Calcio (10 μ M) + CaM (50 U)	75
Ortovanadato de sodio (200 μ M)	94
Cloruro de Zinc (120 μ M)	53

TABLA # 9. EFECTO DE CALCIO, CALMODULINA DE ESPINACA (CaM), ORTOVANADATO DE SODIO, Y CLORURO DE ZINC EN LA ACTIVIDAD DE PROTEINA CINASA DE LA FRACCION OBTENIDA TRATANDO A LOS RIBOSOMAS CON KCl 1.5 M. EL CONTROL SE REALIZO BAJO LAS CONDICIONES DE ENSAYO DESCRITAS EN MATERIALES Y METODOS

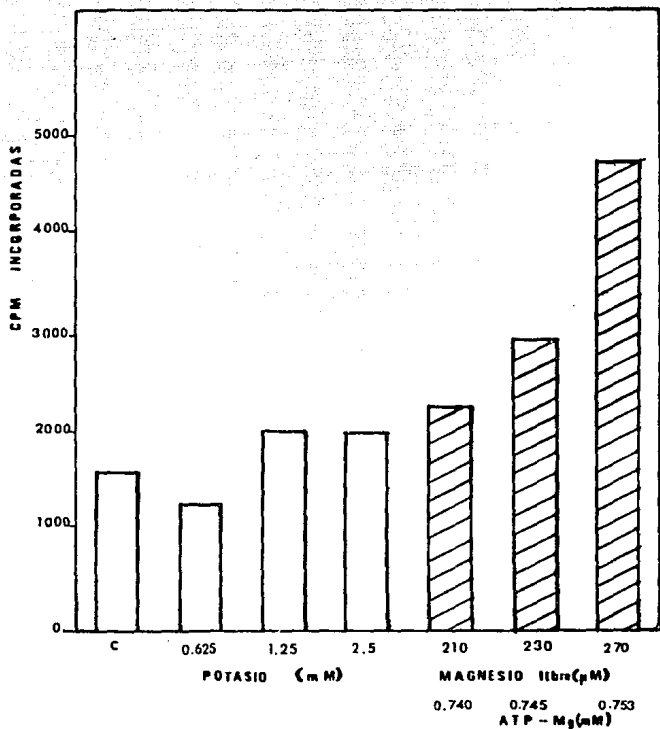


Fig.14 Efecto de la concentración de potasio y de magnesio libre en la actividad de proteína cinasa de la fracción obtenida tratando a los ribosomas con KCl 1.5 M. Las condiciones de ATP-Mg y magnesio libre para el control y con potasio son las descritas en materiales y métodos, mientras que para magnesio son las que se indican en la figura.

condiciones de ensayo utilizadas la aumentó en un 280 % (Fig.14).

Todos estos resultados indicaron que la actividad de proteína cinasa de la fracción obtenida tratando a los ribosomas con KCl 1.5 M, parece ser dependiente de la concentración de magnesio, mientras que el potasio y las poliaminas no parecen afectar esta actividad. Otros cationes como calcio, zinc pueden inhibir la actividad.

5. Purificación parcial de la actividad de proteína cinasa de la fracción obtenida tratando a los ribosomas con KCl 1.5 M.

5.1 Elución por Sefacril S-200.

La fracción obtenida con KCl 1.5M fue utilizada para realizar una cromatografía de filtración en gel (Sefacril S-200). El patrón de elución de dicha fracción mostró dos zonas con la máxima cantidad de proteína (Fig.15: F_2 y F_3) y cinco zonas más que mostraron una cantidad menor de proteína, medida por absorbancia a 280 nm (Fig.15: F_1 , F_4 a F_7).

El patrón electroforético en geles con SDS de estas fracciones, mostró la resolución en las fracciones F_1 , F_2 y F_3 de por lo menos 13, 19 y 17 bandas de proteína respectivamente que se repartieron en todo el rango del marcador de peso molecular (66 a 20 Kd), mientras que en la fracción F_{4-7} que en este caso comprendió las fracciones 4 a la 7, solamente se definieron tres bandas de proteína (bajo las mismas condiciones electroforéticas)

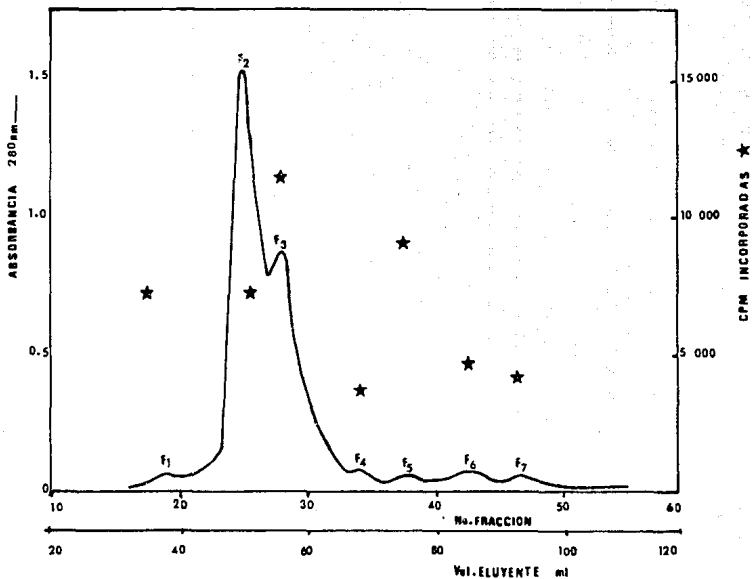


Fig. 15 Elución por Sepacril S-200 del sobrenadante obtenido tratando a los ribosomas con KCl 1.5 M. Cada una de las fracciones (F₁ a F₇) fue utilizada como fuente de enzima para medir la actividad de proteína cinasa, usando como sustrato caseína (★).

de aproximadamente 67, 64 y 17.1 Kd (Fig.16).

Para determinar cual de las fracciones (F₁ a F₇) tenía la actividad de proteína cinasa se realizó un ensayo en cada una de las fracciones, usando como sustrato exógeno a la caseína. Se realizó la electroforesis y la autorradiografía correspondiente, la cual mostró que en las fracciones 1 a la 3 se fosforiló una proteína presente en dichas fracciones (Fig.17 ENDO) de aproximadamente 17.1 Kd de peso molecular. En estas mismas fracciones, también se encontró la fosforilación de dos proteínas de la caseína de aproximadamente 26.0 y de 31.0 Kd de peso molecular (Fig.17). Estas mismas bandas fosforiladas de la caseína también fueron encontradas para el caso de las fracciones F₄ a la F₇ (Fig.17)

La actividad de proteína cinasa que se mostró por autorradiografía del ensayo y que se realizó a cada una de las fracciones, correlacionó con la medición de la actividad usando el método convencional de Roskoski (Fig.15). Usando este método para medir la actividad se encontró que la fracción 2 además de que mostró un pico de cantidad máxima de proteína, mostró un máximo de actividad, por lo cual fue utilizado para conocer algunas características de la actividad obtenida en esta fracción y realizar algunas pruebas de purificación por cromatografía de intercambio cationico (DEAE-celulosa)

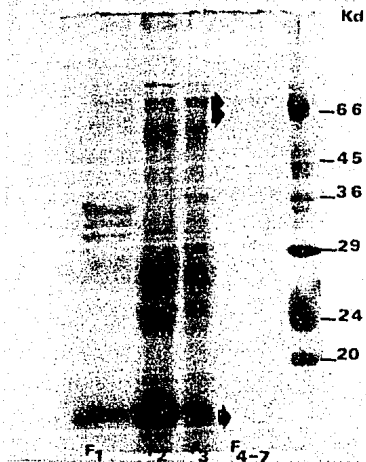


Fig. 16 El sobrenadante obtenido tratando a los ribosomas con KCl 1.5 M, fue sometido a una cromatografía con Sefacril S-200 y se obtuvo el patrón electroforético en geles con SDS, de las proteínas eluidas en cada una de las fracciones (F1, F2, F3 y F4-7).

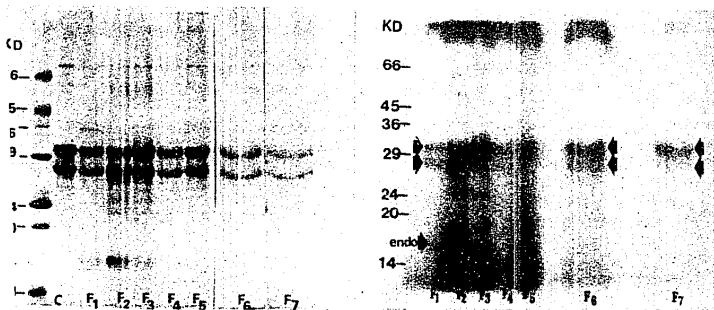


Fig. 17 Fosforilación de caseína (C) y de sustrato endógeno (endo) obtenido en cada una de las fracciones (F1 a F7) eluidas del Sefacril S-200 por la actividad de proteína cinasa obtenida en las mismas fracciones. a) Tinción con azul de coomassie de los geles con SDS de caseína (C) y de las proteínas obtenidas de los ensayos realizados, usando como fuente de enzima a cada una de las fracciones y a la caseína como sustrato. b) Autorradiografía correspondiente.

5.2 Elución por DEAE-celulosa.

En vista de que la fracción 2 (F_2) que se obtuvo con la elución del Sefacril S-200, mostró un pico de cantidad máxima de proteína y de actividad, fue utilizada para realizar una elución por DEAE-celulosa usando un gradiente de KCl en dos fases (de 0 a 0.5M y de 0.5 a 1.0M). En tales condiciones se obtuvo la resolución de esta fracción de por lo menos 15 picos de proteína (Fig.18). El ensayo de actividad de cada una de estas fracciones usando como sustrato a la caseína, mostró una actividad máxima de proteína cinasa que eluyó antes de iniciar el gradiente de 0 a 0.5M de KCl y otra actividad de proteína cinasa que eluyó a una concentración de 0.55 a 0.65M de KCl (Fig.18: picos A y B).

La recuperación de esta columna fue del 15%. Bajo estas condiciones de recuperación, el patrón electroforético con SDS de las fracciones 1 a 3 (F_{1-3}) en las que se encontró actividad de proteína cinasa y que se obtuvo antes de iniciar el gradiente de KCl (Pico A) mostró la presencia de cuatro bandas proteicas de 66.0, 64.0, 30.8 y 17.2 Kd de peso molecular. Mientras que las fracciones 12 a 14 que mostró también actividad y que eluyó de 0.55 a 0.65M de KCl (Pico B) solamente se resolvieron dos bandas proteicas de 66.0 y 64.0 Kd de peso molecular (Fig.19).

Los resultados obtenidos tanto con la elución por filtración en gel (Sefacril S-200) como por cromatografía de intercambio catiónico (DEAE-celulosa) indicaron resoluciones y

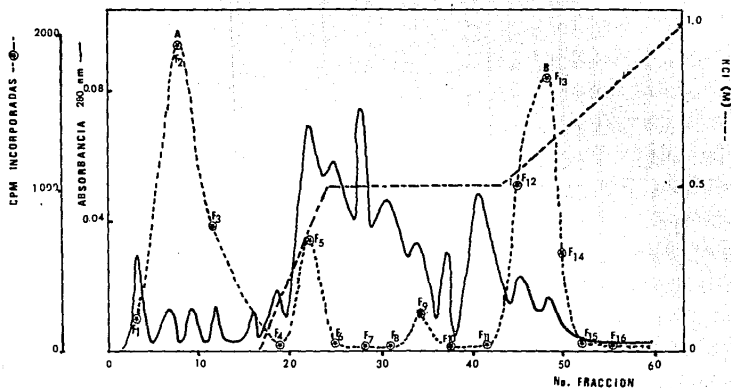
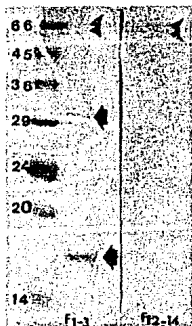


Fig.18 Patrón de elución en DEAE-celulosa de la fracción 2 obtenida del Sefacril S-200 usando como eluyente al KCl (----). La actividad de proteína cinasa en cada una de las fracciones que se muestra en línea discontinua, se probó usando caseína como sustrato. Los picos de actividad máxima son en A: antes de iniciar el gradiente y en B: con KCl 0.55 M a 0.65 M. La línea continua representa la absorbancia a 280nm de la proteínas eluidas.



A

B

Fig. 19 Tinción con azul de coomassie de los gels con SDS, de las proteínas eluidas en las fracciones obtenidas con DEAE-celulosa que mostraron actividad de proteína cinasa son en A: antes de iniciar el gradiente de KCl y en B: eluida con 0.55-0.65M de KCl.

recuperaciones muy bajas, por lo que se usó la fracción 2 del Sefacril S-200 para los siguientes estudios. Sin embargo, en el futuro se deberá de realizar algunas modificaciones en la purificación de la actividad de la proteína cinasa que se encontró en la fracción obtenida tratando a los ribosomas con KCl 1.5M, a fin de incrementar los rendimientos.

6. Características de la actividad de proteína cinasa eluida de la columna de Sefacril S-200.

Los resultados que se obtuvieron con la elución del Sefacril S-200 indicaron que la fracción 2 (F₂) mostraba un máximo de actividad así como de proteína, por lo que fue utilizada para determinar algunas características de la actividad que eluyó en esta fracción.

Usando como sustrato exógeno a la caseína, se encontró que cationes como el zinc (200 µM) y el calcio (50 µM) inhibieron en un 15 y en 28% respectivamente la actividad que se obtuvo en dicha fracción. El magnesio (27 µM libre) y la poliamina espermina (1 mM) no afectaron la actividad de la enzima eluida en la fracción 2 (Tabla # 10).

Por otra parte, la combinación de calcio y de calmodulina de dos orígenes diferentes ya sea de espinaca o de maíz, inhibieron en un 25 y en un 35 % respectivamente la actividad de proteína cinasa obtenida en esta fracción (Tabla # 10).

TRATAMIENTO	ACTIVIDAD %
CONTROL	100
COLORURO DE ZINC (200 μ M)	85
ACETATO DE MAGNESIO (27 μ M)	112.8
ESPERMINA (100 μ M)	104.4
COLORURO DE CALCIO (50 μ M)	72.4
CALCIO (50 μ M) + CaM de espinaca (50 U)	75.4
CALCIO (50 μ M) + CaM de maíz (50 U)	65.4

TABLA #10. EFECTO DE DIVERSOS CATIONES, ESPERMINA Y CALMODULINA, EN LA ACTIVIDAD DE PROTEINA CINASA OBTENIDA EN LA FRACCION 3 ELUIDA DEL SEFACRIL S-200. LA ACTIVIDAD SE MIDIO USANDO COMO SUSTRATO CASEINA (24 μ M) Y EN LAS CONDICIONES DE ATP-Mg QUE SE INDICAN EN MATERIALES Y METODOS.

Para determinar la especificidad por sustrato que tiene la actividad de proteína cinasa obtenida en esta fracción, se realizó un ensayo usando distintos sustratos: la caseína, proteínas ribosomales extraídas por el método de Ramjoué y Gordon (1977) y tratadas a 70°C por 30 min y ribosomas tratados a 70°C u 80°C por 30min. Este tratamiento con calor permite destruir la actividad de proteína cinasa endógena, con lo que es posible obtener una fracción de proteínas ribosomales o de ribosomas como fuente de sustrato.

Con el tratamiento a 70°C aún permaneció cierta actividad endógena de los ribosomas, por lo que se restó a la actividad endógena de los ribosomas no tratados con calor, la actividad remanente después del tratamiento del control. Sin embargo, el tratamiento a 80°C permitió destruir en su totalidad esta actividad endógena ribosomal. Para cada uno de los casos, la cantidad de proteína usada como sustrato fue igualada midiendo la proteína por el método colorimétrico de Bradford (1976). En tales condiciones, los resultados mostraron que usando ribosomas tratados a 70°C o a 80°C como sustrato, se produce un aumento de un 93 y un 75 % respectivamente, en la velocidad de incorporación en relación con la velocidad que se obtuvo cuando el sustrato fue la caseína (considerada como control y tomada como equivalente al 100 % de la actividad). Cuando se utilizó como sustrato a las proteínas ribosomales tratadas a 70°C, se encontró un 30% menos de la actividad que se tuvo cuando el sustrato fue la caseína (Tabla # 11).

SUSTRATO	ACTIVIDAD(%)
CASEINA	100
RIBOSOMAS a 70°C X 30min	192.7
RIBOSOMAS a 80°C X 30min	176.0
PROTEINAS RIBOSOMALES a 70°C X 30min	70.3

TABLA 11. ACTIVIDAD DE PROTEINA GINASA DE LA FRACCION 3 ELUIDA DEL SEFACRIL S-200 USANDO COMO SUSTRATOS: CASEINA (24 μ M) Y A LA MISMA CONCENTRACION RIBOSOMAS TRATADOS A 70°C u 80°C X 30min Y A PROTEINAS RIBOSOMALES TRATADAS A 70°C X 30min.

7. Actividad de fosfatasa.

En vista de que se conoce que las reacciones de fosforilación y defosforilación son de recambio rápido, y que son catalizadas por proteínas cinasas y por proteínas fosfatasas respectivamente y en vista de que se encontró actividad de proteína cinasa en ribosomas, otro de los objetivos de este trabajo fue determinar si también existía actividad de proteína fosfatasa en los ribosomas. Como un primer acercamiento para determinar si existe esta actividad en los ribosomas, se midió dicha actividad usando en el ensayo un inhibidor de fosfatasas de amplio espectro: β -glicerofosfato (80mM). La cinética en ausencia y en presencia del inhibidor no mostró diferencias importantes. En ambos casos, la actividad aumentó hasta los 3 min de incubación, se mantuvo constante y posteriormente volvió a aumentar la incorporación. Esto sugiere que si existe actividad de proteína fosfatasa en ribosomas, parece no ser afectada por β -glicerofosfato (Fig. 20).

Por lo anterior y como otra alternativa a fin de probar si realmente existía actividad de fosfatasa en los ribosomas y si ésta actividad también era separada de los mismos en los sobrenadantes obtenidos (Sb1, Sb2 y Sb3) por el tratamiento de los ribosomas con concentraciones altas de sales, se midió la actividad de fosfatasa usando como fuente de enzima a cada uno de los sobrenadantes y como sustrato al p-nitrofenilfosfato, y en segundo lugar se determinó si existía actividad de proteína fosfatasa en el ribosoma. La cinética utilizando a los tres

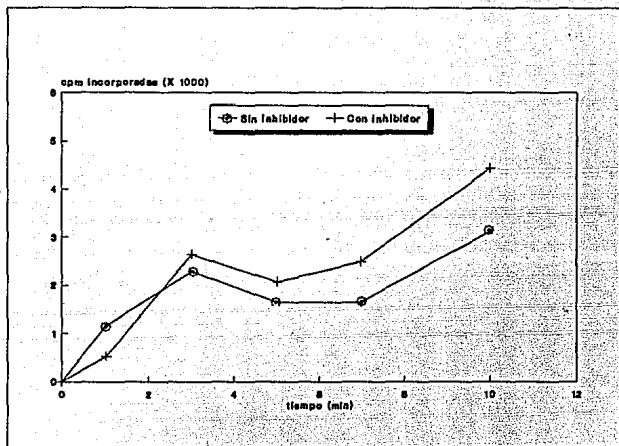


Fig.20 Efecto del inhibidor: β -glicerofosfato (+) en la actividad de proteina cinasa de ribosomas.

sobrenadantes como fuente de enzima indicó que había una mayor actividad de fosfatasa en el sobrenadante que se obtuvo con el tratamiento de KCl 1.0M (Sb1) que en el Sb2 o en el Sb3 (Fig.21).

Esta actividad de fosfatasa que se obtuvo en el Sb1 no fue afectada por la presencia de calcio (10 μ M) y de calmodulina de espinaca (50 Unidades) en el sistema (Fig.22), por lo que se puede sugerir que esta actividad bajo las condiciones probadas parece no ser dependiente de calcio y calmodulina

Para conocer algunas de las características de esta actividad de fosfatasa, se determinó el efecto de diferentes inhibidores en la actividad de dicha enzima obtenida en el Sb1 y en el Sb2. Para el caso del Sb1, se encontró que fluoruro de sodio (NaF) a una concentración de 10 mM y molibdato de amonio (10 μ M), no tuvieron efecto, mientras que en el Sb2 inhibieron en un 36 y 33 % respectivamente a estas concentraciones. β -glicerofosfato (320 mM) no tuvo efecto en la actividad obtenida en el Sb1, mientras que ortovanadato de sodio (200 μ M) inhibió hasta en un 74 % la actividad obtenida en ambos sobrenadantes. Finalmente cloruro de zinc ($ZnCl_2$) a una concentración de 120 μ M inhibió la actividad de fosfatasa en el Sb1 y en el Sb2 hasta en un 86 y 73 % respectivamente (Tabla # 12).

Los resultados anteriores indicaron que existe actividad de fosfatasa en los sobrenadantes obtenidos tratando a los ribosomas con KCl 1.0 y 1.5 M. La mayor actividad se obtuvo preferencialmente en el Sb1 y ésta actividad es inhibida por

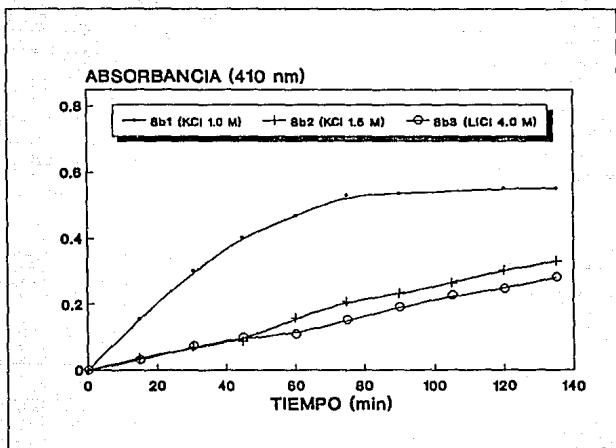


Fig. 21 Actividad de fosfatasa en los sobrenadantes obtenidos tratando a los ribosomas con KCl 1.0 M (Sb 1), KCl 1.5 M (Sb 2) y LiCl 4M (Sb 3).

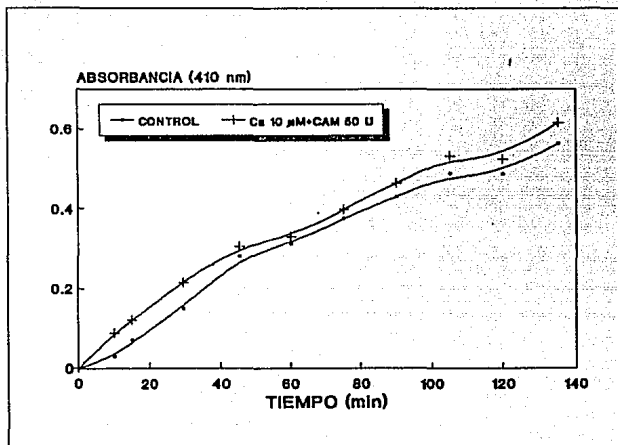


Fig. 22 Actividad de fosfatasa en el sobrenadante obtenido tratando a los ribosomas con KCl 1.0 M (Sb 1) en presencia de calcio (10 μ M) y de calmodulina de espinaca (50 U).

INHIBIDOR	CONCENTRACION	% DE INHIBICION	
		Sb1	Sb2
NaF	10 mM	0	36
MOLIBDATO	10 μ M	0	33
B-GLICEROLFOSFATO	320 mM	0	N.D.
ORTOVANADATO	50 μ M	16	N.D.
	200 μ M	74	74
ZnCl ₂	30 μ M	25	N.D.
	120 μ M	86	73

TABLA # 12. ACTIVIDAD DE FOSFATASA EN LOS SOBRENADANTES OBTENIDOS CON EL TRATAMIENTO DE LOS RIBOSOMAS CON KCl 1.0M(Sb1) Y KCl 1.5M(Sb2) EN PRESENCIA DE DIFERENTES INHIBIDORES

ZnCl₂ (120 μM) y ortovanadato de sodio (200 μM). Mientras que β-glicerofosfato, calcio y calmodulina no afectaron esta actividad.

8. Actividad de proteína fosfatasa.

Tomando en cuenta que se encontró actividad de fosfatasa principalmente en los extractos Sb1 y Sb2 (Fig.21) de los ribosomas, se quiso saber si se trataba de una proteína fosfatasa. Para tal efecto, se realizó un ensayo de proteína fosfatasa usando como sustrato a los ribosomas fosforilados por la actividad de proteína cinasa endógena de los mismos. Los ribosomas fosforilados de esta forma, posteriormente fueron incubados durante 0, 15, 30 y 60 minutos en un ensayo de actividad de proteína fosfatasa. La autorradiografía correspondiente de cada uno de los tiempos de incubación indicó que la actividad de fosfatasa medida con p-nitrofenilfosfato, parecería corresponder a una actividad de proteína fosfatasa en los ribosomas, ya que la cantidad de fosfato incorporado a los 15 min y sobretodo a los 60 min de incubación en la proteína ribosomal de 17.8 Kd de peso molecular disminuyó, con respecto a la cantidad incorporada a la misma banda proteica en el tiempo cero de incubación (es decir antes de agregar ATP no radioactivo a una concentración 200 veces mayor a la utilizada en el ensayo de protein cinasa) (Fig.23) A los 30 min de incubación se observó una disminución en la cantidad de la marca incorporada en todas las bandas de proteína, sin embargo este hallazgo

correlacionó con una menor cantidad de proteína aplicada en la electroforesis en geles con SDS, no así en la de los 15 y 60 min de incubación que contenían igual cantidad de proteínas ribosomales que el tiempo cero (Fig.24).

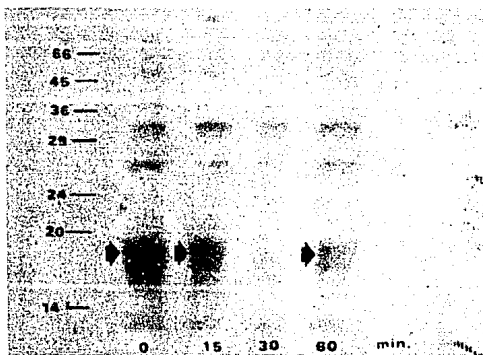


Fig. 23 Actividad de proteína fosfatasa en ribosomas. Los ribosomas fueron fosforilados por la actividad endógena de proteína cinasa, lavados con ATP frío e incubados 0, 15, 30 y 60 min en una mezcla de ensayo de proteína fosfatasa. Se obtuvo el patrón electroforético de las proteínas ribosomales y después de 4 días de exposición se obtuvo la autorradiografía correspondiente.

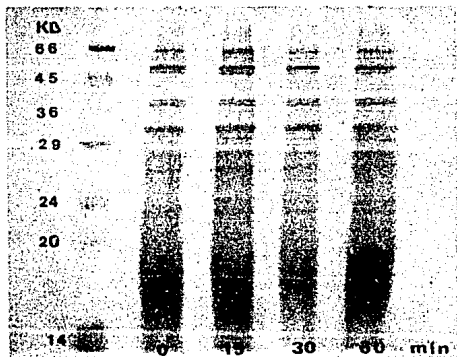


Fig. 24 Tinción con azul de coomassie de los gels con SDS de las proteínas ribosomales obtenidas de los ribosomas fosforilados e incubados en la mezcla de ensayo para proteína fosfatasa.

DISCUSION

En el presente trabajo se reporta la actividad de proteína cinasa en ribosomas de ejes embrionarios de maíz. Esta actividad se pudo medir en ribosomas lavados con altas concentraciones de sales de potasio, lo cual se sabe elimina del ribosoma los factores de iniciación y elongación de la síntesis de proteínas y las enzimas como la Met-tRNA hidrolasa y algunas proteínas cinasas citoplásmicas (3,22,39,51,76). La actividad de proteína cinasa se observó *in vitro* usando como sustrato caseína purificada (Tabla # 7). Asimismo, el análisis del patrón de fosforilación de los ribosomas, incubados únicamente con [32 P- γ] - ATP confirmó la existencia de actividad de proteína cinasa en los ribosomas, la cual, además de usar como sustrato a la caseína, puede fosforilar también a las proteínas ribosomales (Fig. 6a, b). En este caso se dice que hay autofosforilación en el sentido de que no se agregó ninguna proteína cinasa al sistema y se supone que solo están presentes las proteínas estructurales del ribosoma (12,107). Sin embargo, con los resultados que se tienen hasta el momento no se puede saber si la enzima realmente se fosforila a sí misma. Una actividad de esta naturaleza ha sido también encontrada en los ribosomas de la glándula pituitaria anterior de bovino, de reticulocitos de conejo, de chícharo y de *Lemna minor*. En cada uno de estos casos esta actividad permanece en los ribosomas aún cuando han sido tratados con KCl de 0.5 a 0.7M o bien con cloruro de amonio de 0.5 a 1.0M (3,51,116). Esta actividad endógena

solamente es destruida en germen de trigo cuando los ribosomas se trataron a 70°C por 10 min (12).

No es fácil afirmar que una proteína ribosomal además de ser proteína estructural tenga una función enzimática, ya que en general se considera que las proteínas ribosomales son únicamente soporte de la estructura ribosomal (62,81). Por otra parte, la identificación de las proteínas que constituyen realmente al ribosoma no está basada en criterios precisos. Algunos autores han sugerido que una proteína ribosomal, es aquella que forma parte de los ribosomas activos después de que estos han sido lavados bajo condiciones salinas rigurosas (con KCl 0.5 a 1.0 M), mientras que tratamientos con concentraciones altas de sales (LiCl 1.0 a 4.0 M) destruyen la integridad del ribosoma y permite la separación de las proteínas ribosomales libres del ARN (25,83,107). Considerando estos criterios, los ribosomas obtenidos con KCl 0.5 M fueron tratados con lavados subsecuentes de fuerzas iónicas mayores de KCl, con las que se ha supuesto se separa a las proteínas estructurales del ribosoma (25) (Fig. 4). El tratamiento de los ribosomas con KCl 1.0 M y con un segundo tratamiento subsecuente de KCl 1.5 M permitió separar la mayor parte de la actividad de proteína cinasa del ribosoma, pero aún se logró obtener actividad remanente con un tercer tratamiento del corazón ribosomal con LiCl 4M (Fig. 11) Con todo esto se puede decir que la actividad endógena de proteína cinasa fué debida a una proteína firmemente unida al ribosoma, la que podría tratarse de una proteína estructural. Los resultados obtenidos no permiten saber sin

embargo, si esta actividad es debida a una sola o a varias enzimas. Sin embargo, debido a que la actividad no se libera totalmente del ribosoma, sino que se distribuye en fracciones de diferente fuerza iónica, esto pudiera indicar que se trata de más de una enzima.

Para conocer si existe una o más proteína cinasa(s) en los ribosomas así como sus características cinéticas se requiere de un mayor grado de purificación de la enzima. En este estudio se probaron algunos pasos de purificación. De las siete fracciones obtenidas con Sefacril S-200 que mostraron actividad de proteína cinasa al menos dos de ellas tuvieron niveles importantes de esta actividad lo que apoyaría la posible existencia de más de una proteína cinasa (Fig. 15). Sin embargo, el patrón electroforético en geles con SDS de las fracciones mostró que en cada una de ellas se eluyeron proteínas en un rango amplio de peso molecular (Fig. 16), lo que sugiere una resolución baja de la columna. Esto puede deberse al procedimiento de elución usado, o bien al tratamiento de la muestra, ya que las proteínas ribosomales por sus características especiales, como son su poca solubilidad en soluciones amortiguadoras ordinarias y su extrema basicidad, tienden a agruparse, lo que hace difícil su purificación (126). La primera de estas posibilidades queda descartada ya que se obtuvo una curva adecuada de calibración de pesos moleculares con el mismo procedimiento y en las mismas condiciones de elución de la muestra (Fig. 5). Por tanto es posible que se requiera de algún

tratamiento adicional de la muestra que permita una mejor resolución de las proteínas ribosomales.

Por otra parte el patrón de elución en DEAE-celulosa y la medición de la actividad de proteína cinasa en cada una de las fracciones, mostró la resolución de dos picos con actividad enzimática, una antes de comenzar el gradiente de KCl y otra a una concentración de KCl de 0.55 a 0.65M (Fig. 18). Estos resultados apoyan la interpretación de que en los ribosomas pudiera haber dos proteína cinasas o dos formas de agregación de la misma cinasa. No fué posible realizar una mejor identificación de ambas actividades debido a la recuperación tan baja que se obtuvo.

El mecanismo molecular por el cual una proteína estructural con actividad de proteína cinasa pueda fosforilar a otras proteínas ribosomales implicaría que los sitios de fosforilación y el sitio activo de la enzima debieran estar en el ribosoma en una conformación tal que permitiera la máxima interacción de ambas moléculas. Esto es factible si se considera que los ribosomas por su funcionalidad son estructuras que muestran un grado alto de flexibilidad (59). Además, las propias proteínas cinasas, por ser ellas mismas proteínas, se pueden autofosforilar, inclusive intramolecularmente, como ocurre con la proteína cinasa purificada de la membrana plásmatica de chícharo (6). Más aún, el patrón de autofosforilación *in vitro* de los ribosomas, mostró por lo menos diez bandas de proteínas fosforiladas (Fig. 6b). En general, el

número de proteínas ribosomales que se fosforilan varía de un sistema a otro y en este caso no puede ser tan exacto ya que aunque se obtuvo una buena resolución en geles unidimensionales, existen proteínas ribosomales de las dos subunidades que tienen pesos moleculares muy semejantes con lo que muy probablemente en este tipo de geles cada una de estas bandas esta formada por más de una proteína, lo que no permite hacer una identificación definitiva. En tal caso sería conveniente tener una mejor resolución, alternativamente se deberá realizar un gel bidimensional y para obtener una mejor información de su localización en el ribosoma se deberá realizar la fosforilación *in vitro* en las subunidades ribosomales aisladas, con lo que también se podría tener información de donde se localiza la actividad de proteína cinasa. No obstante, Browning (1989) en un sistema semejante de geles unidimensionales y de fosforilación *in vitro* de ribosomas de germen de trigo, demostró la fosforilación de tres proteínas ribosomales localizadas en la subunidad 60S. Dos de éstas proteínas de 12.6 y de 38.1 Kd de peso molecular coinciden con el peso molecular de dos de las proteínas ribosomales que se fosforilaron en los ribosomas utilizados en este estudio. Esto permite sugerir que pueden tratarse de proteínas de la subunidad 60S. Asimismo, por otros estudios realizados en nuestro laboratorio se ha confirmado que las proteínas de 13.8, 16.6 y de 38.0 Kd que se fosforilan *in vivo* en estos ribosomas son denominadas las proteínas ácidas (Briones E, comunicación personal).

En otros estudios en el laboratorio se ha obtenido el patrón de fosforilación *in vivo* de los ribosomas de maíz (84). Comparando este patrón de fosforilación con el obtenido *in vitro* en este trabajo se puede decir que las proteínas de 52.5, 42.6, 38.0, 26.3, 22.4, 16.6 y 13.8 que se fosforilaron *in vitro* pudieran ser las mismas que se fosforilaron *in vivo*, mientras que ambos patrones difieren en que: 1) las proteínas de 34.6 y 12.6 que se fosforilaron *in vitro* no son fosforiladas *in vivo*, 2) la proteína de 30.9 (probablemente S6) que es fosforilada *in vivo* y cuya fosforilación parece estar regulada por el desarrollo (germinación) no es fosforilada *in vitro* y 3) que *in vitro* no se muestra preferencia por la fosforilación de algunas de las proteínas, mientras que *in vivo* la fosforilación de las proteínas de 30.9, 13.8 y 16.6 parece estar regulada por el desarrollo. Estas diferencias podrían deberse a un cambio conformacional en los ribosomas en el momento de la extracción que podría hacer más accesibles otros sitios que no son fosforilables *in vivo*, o bien bajo las condiciones de ensayo *in vitro* la actividad de proteína cinasa podría mostrar un especificidad menor por algunos sustratos que la que muestra *in vivo* (3,28). Además debe considerarse que otras proteínas cinasas están presentes en el citoplasma de los ejes de maíz en germinación (Gamboa A, comunicación personal) las cuales podrían también contribuir a la fosforilación de las proteínas ribosomales.

Los resultados de estudios cinéticos realizados con la fracción de KCl 1.5 M (Sb 2) dió una Km aparente para caseína (Fig.13), menor que la encontrada para la proteína cinasa de germen de trigo (128,129). Sin embargo, cuando se probó en una preparación más pura (obtenida después de Sefacril S-200) la especificidad de la proteína cinasa con diferentes sustratos: caseína, ribosomas tratados a 70° u 80°C por 30 min (a fin de destruir la actividad de proteína cinasa endógena en el sustrato), 6 proteínas ribosomales libres (obtenidas por el método de Ramjoué y Gordon y tratadas a 70°C por 30 min), se observó preferencia por fosforilar a los ribosomas integrados, ya que en este caso se tuvo una velocidad de incorporación de ^{32}P superior a la obtenida con la caseína o las proteínas ribosomales libres (Tabla # 11). Resultados semejantes se han obtenido para la proteína cinasa de soya (39). Esta preferencia de la proteína cinasa por los ribosomas podría indicar que hay una disposición estructural de las proteínas en el ribosoma la cual es reconocida por la proteína cinasa.

Cuando se probó el efecto de la concentración de magnesio en la actividad de proteína cinasa de ribosomas obtenidos en presencia de EGTA (Fig.9), se observó tanto un aumento considerable en la incorporación de ^{32}P , en las mismas proteínas que se fosforilan como del número de proteínas fosforiladas (Fig.10). Dado que la estructura ribosomal es alterada por la presencia del agente quelante aplicado, el cual causa la

separación de las subunidades con lo que se puede llegar a la liberación de algunas proteínas (62,80), se puede sugerir que la estimulación observada se deba a las siguientes causas: a) que las proteínas-sustrato pudieran adoptar una conformación en presencia de EGTA en la que se tuviera accesibilidad muy limitada a los sitios fosforilables, o bien b) que el magnesio además de ser requerido para formar el complejo ATP-Mg se necesite para la actividad enzimática o para la activación de la proteína cinasa y que esto le permita realizar la actividad de fosforilación con mayor eficiencia. Esto último se sugiere porque bajo las condiciones en las que se midió el efecto del magnesio, la concentración del complejo ATP-Mg se mantuvo constante, por lo que el magnesio que permanece libre en el sistema es el que ejerce el efecto estimulador (Fig.9). Asimismo, cuando la actividad de proteína cinasa se obtuvo en forma semipurificada y usando caseína como sustrato (Fig.14), también se observó un aumento considerable de la actividad en presencia del cation. Aunque en este caso, dado a que el ensayo se realizó bajo concentraciones no constantes de ATP-Mg, por lo que no se puede descartar la posibilidad de que el efecto estimulador del magnesio sea debido a una mayor formación del complejo ATP-Mg, tampoco se puede descartar la posibilidad de que el incremento considerable en la actividad sea debido a un efecto estimulador del magnesio sobre la enzima misma. Todos estos resultados apoyan la idea de que probablemente el efecto del cation, es sobre la enzima misma y no sobre la estructura del ribosoma.

Se han encontrado diversos reguladores o cofactores para la actividad de las proteínas cinasas en plantas (Tabla # 3). Entre ellos están el calcio, la calmodulina y las poliaminas que han mostrado tener un efecto estimulatorio en la fosforilación de las proteínas de la membrana plasmática de chícharo y de coleoptilos de maíz, de tonoplasto de *Acer pseudoplatanus*, de las vesículas microsomales de las raíces de maíz y de las proteínas nucleares de chícharo (6,24,114,119,130). Por otra parte, también se ha encontrado que el calcio y las poliaminas inhiben la actividad de las proteínas cinasas purificadas de germen de trigo, de embriones de cebada y de hipocotilos de soya (64,99,101). En este trabajo, cuando se usó el extracto crudo de ribosomas se encontraron ambos efectos (tanto estimulatorio como inhibitorio) en la actividad de proteína cinasa por poliaminas y por el complejo calcio-calmodulina dependiendo del tiempo de incubación (Fig.7). Mientras que cuando la actividad de proteína cinasa se separó de los ribosomas en la fracción Sb 2, las poliaminas no tuvieron un efecto considerable y el calcio solo o con calmodulina inhibieron la actividad. Asimismo, en preparaciones más purificadas (Sb 2 pasado por Sefacril S-200) se observó solo inhibición de la actividad de proteína cinasa por el calcio, calcio y calmodulina, independiente del origen de la calmodulina que se utilizó (Tablas 9 y 10). Este efecto inhibitorio del calcio puede ser dado en parte a que interfiere en la formación del complejo ATP-Mg, ya que bajo las condiciones de ensayo que se utilizaron tiende a formar

complejos con el ATP. No obstante, como se puede observar todos estos resultados con estos efectores son aparentemente contradictorios y no concluyentes, sin embargo cabe recordar que han sido obtenidos con preparaciones no muy puras de enzima, por lo cual se sugiere que para conocer con certeza como afectan la actividad de proteína cinasa se deberá obtener una preparación purificada de la enzima, ya que en las condiciones en las que se midió la actividad de proteína cinasa probablemente puedan existir otros factores que intervengan en la medición de dicha actividad. Uno de ellos podría ser la presencia de proteínas fosfatasas que en un momento dado pudieran contarrestar el efecto producido por la actividad de proteína cinasa. Esto se sugiere por que se encontró en este trabajo actividad de proteína fosfatasa en los ribosomas, como lo muestran los resultados del ensayo de proteína fosfatasa en ribosomas revelado por la autoradiografía respectiva (Fig.23). Aunque este experimento fué preliminar ya ha sido posteriormente confirmado en nuestro laboratorio (Aguilar R, comunicación personal). En vista de que la actividad de tirosina proteína fosfatasa de p ántulas de trigo puede utilizar como sustrato al p-nitrofenilfosfato (16), dadas las dificultades de utilizar un sustrato protéico fosforilado, se utilizó al p-nitrofenilfosfato para medir la actividad de dicha enzima (indicada como fosfatasa) en las fracciones Sb1 y Sb2. En este caso se pudieron distinguir dos comportamientos un tanto diferentes: ambas fracciones (Sb1 y Sb2) muestran inhibición de la actividad por ortovanadato y zinc; sin embargo, la del Sb1 no es

inhibida por fluoruro y molibdato mientras que la del Sb2 si lo es, a la misma concentración de inhibidores (Tabla 12). Al respecto, el efecto de zinc y fluoruro ha sido descrito para la inhibición de las proteínas fosfatasa de embriones de trigo, de hipocotilos de soya y de plántulas de trigo (16,65,90) y el efecto de molibdato y vanadato para la inhibición de las proteínas fosfatasa de embriones y de plántulas de trigo (16,90). Además en forma semejante a las proteína fosfatasa de soya y de plántulas de trigo (16,65), la actividad del Sb1 no fué afectada por calcio. En este último caso no se conoce si el calcio afecte la actividad del Sb2 porque no se realizó el ensayo respectivo. No obstante, todos los resultados indican que existe proteína fosfatasa en los ribosomas de ejes embrionarios de maíz por lo que es importante diferenciar de que tipo de proteína fosfatasa se trata en base a los criterios establecidos en la literatura en cuanto a especificidad de sustratos y al efecto de otros inhibidores como son los inhibidores I y II de mamíferos, el ácido okadaico y las microcistinas (19).

CONCLUSIONES

El presente trabajo muestra que existe actividad endógena de proteína cinasa en ribosomas de ejes embrionarios de maíz. Esta actividad endógena es debida probablemente a una(s) proteína(s) estructural(es) del ribosoma, la cual fué posible separarla de los mismos bajo condiciones salinas.

La proteína cinasa endógena de ribosomas fué capaz de fosforilar *in vitro* tanto a sustratos exógenos (caseína e histonas) como sustratos endógenos (proteínas ribosomales: autofosforilación), sin embargo cuando la actividad se purificó parcialmente mostró preferencia por usar como sustratos a los ribosomas integrados en vez de la caseína o a las proteínas ribosomales libres.

Entre las proteínas ribosomales que son fosforiladas *in vitro* por la actividad endógena de proteína cinasa están las de 52.5, 42.6, 38.0, 34.5, 26.3, 22.4, 20.0, 16.6, 13.8 y 12.6 Kd de peso molecular. Solamente se puede sugerir que las proteínas de 16.6 y 13.8 Kd pudieran tratarse de las proteínas ácidas equivalentes a las L7 y L12 de *E. coli*.

Los resultados indican que es muy probable que exista una proteína fosfatasa en los ribosomas de ejes embrionarios de maíz. Esta actividad es inhibida por ortovanadato y zinc.

Finalmente, hasta el momento no es posible definir el significado funcional de la actividad de proteína cinasa y de proteína fosfatasa encontradas en ribosomas de ejes embrionarios de maíz. Sin embargo, podría postularse que tal vez sean relevantes en el proceso de traducción.

SUGERENCIAS PARA TRABAJOS FUTUROS

Para conocer si la actividad de proteína cinasa de ribosomas es debida a una o más proteínas ribosomales así como sus características cinéticas, se deberá de obtener una preparación de la enzima con un grado mayor de purificación, para lo cual se sugiere realizar tratamientos adicionales a la muestra o en el procedimiento de elución, que permitan una mejor resolución de las proteínas ribosomales.

Por otra parte, para definir el tipo de proteína fosfatasa presente en los ribosomas se sugiere medir dicha actividad usando sustratos más adecuados (proteínas fosforiladas) así como inhibidores más específicos de la actividad de proteínas fosfatasas.

BIBLIOGRAFIA

1. Anderson J.M. (1989). Membrane derived fatty acids as precursors to second messengers. En: Plant Biology Vol.6. Second messengers in plant growth and development. Alan R.Liss Inc. New York. E.U.A ISBN 0-8451-1805-6. pp: 181-212.
2. Andres J.L and J.L Maller (1989). Purification and characterization of a novel protein phosphatase highly specific for ribosomal protein S6. J.Biol.Chem. 254 (1): 151-156.
3. Barden N and F.Labrie (1973). Cyclic adenosine 3'5' monophosphate dependent phosphorylation of ribosomal proteins from bovine anterior pituitary gland. Biochem.J. 12 (16): 3096-3102.
4. Blackshear P.J, A.C Nair and J.F.Kuo. (1988). Protein kinases 1988: a current perspective. FASEB J. 2: 2957-2969.
5. Blowers D.P, A.M. Hetherington and A.Trewavas (1985). Isolation of plasmalemma bound calcium/calmodulin regulated protein kinase from pea using western blotting. Planta. 166:208-215.
6. Blowers D.P and A.Trewavas (1987). Autophosphorylation of plasmalemma bound calcium calmodulin dependent protein kinase from pea seedlings and modification of catalytic activity by autophosphorylation. Biochem. Biophys. Res. Comm. 143(2): 691-696.
7. Blowers D.P and A.Trewavas (1988). Phosphatidylinositol kinase activity of a plasmalemma associated. Calcium activated protein kinase from pea. Febs.Lett. 238(1): 87-89.
8. Blowers D.P and A.Trewavas (1989). Second messengers: Their existence and relationships to protein kinase. En: Plant Biology Vol.6. Second messengers in plant growth and development. Alan R. Liss Inc. New York E.U.A. ISBN 0-8451-1805-6. pp: 1-28.
9. Bogre L, Z.Olah, D.Dodis (1988). Ca⁺²-dependent protein kinase from alfalfa (*Medicago varia*). Partial purification and autophosphorylation. Plant Sci. 85: 135-144.
10. Boss W.F. (1989). Phosphoinositide metabolism: its relation to signal transduction in plants En: Plant Biology Vol.6. Second messengers in plant growth and development. Alan R.Liss Inc. New York E.U.A ISBN 0-8451-1805-6. pp: 29-56.

11. Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* 72: 248-254.
12. Browning K.S, Y.James, T.Fuh, S.J.Laver, A.Aquino, and M.Tao (1985). Phosphorylation of wheat germ initiation factors and ribosomal proteins. *Plant Physiol.* 77: 370-373.
13. Carte P.J, H.G. Nimmo, C.A. Fewson and M.B. Wilkins. (1990). *Bryophyllum fedtschenkoi* protein phosphatase type 2A can dephosphorylate phosphoenolpyruvate carboxylase. *FEBS Lett.* 263(2): 233-236.
14. Catterall W.A, K.Nunoki, Y.Lai, K.De Jongh, W.Thomsen and S.Rossie (1990). Structure and modulation of voltage sensitive sodium and calcium channels. *En. Advances in second messenger and phosphoprotein research.* A Raven Press. New York. ISBN 0-88167-670-5. 24: 30-36.
15. Changeux J.P, P.Benoit, A.Bessis, J.Cartaub, A.Devillers-Thiery, B.Fontaine, J.L.Galzi, A.Krarsfeld, R.Laufer, C.Mulle, H.O.Nghiem, M.Osterlumd, J.Piette and F.Revah. (1990). The acetylcholine receptor. Functional architecture and regulation. *En: Advances in second messenger and phosphoprotein research.* A Raven Press. New York. ISBN 0-88167-670-5. 24: 15-20.
16. Cheng H-F and M.Tao (1989). Purification and characterization of a phosphotyrosyl protein phosphatase from wheat seedlings. *Biochem. Biophys.Acta.* 998: 271-276.
17. Chiatante D, M.Levi, S.Sgorbati and E.Sparvoli (1987). protein kinase activity in meristematic root of *Pisum sativum* during germinating. *Plant Sci.* 53: 271-279.
18. Cohen P. (1985). The role of protein phosphorylation in the hormonal control of enzyme activity. *Eur.J.Biochem.* 151: 439-448.
19. Cohen P. (1989). The structure and regulation of protein phosphatase. *Annu. Rev.Biochem.* 58: 453-508.
20. Cohen P, Ch.F.B. Holmes and Y. Tsukitani. (1990). Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation. *Trens in Biochem. Sci.* 15: 98-102
21. Crum C, J.Hu, H.J.Hidding and Don A.Roth. (1988). Tobacco mosaic virus infection stimulates the phosphorylation of a plant protein associated with double-stranded RNA dependent protein kinase activity. *J.Biol.Chem.* 263(26): 13440-13443.

22. Crystal R.G, A.E.Norton and W.F.Anderson. (1974). Initiation of globin synthesis: Assays. Methods. Enzymol. 30: 101-107.
23. Danko J.S and P.J.Markewll. (1985). Protein phosphorylation in plant mitochondria. Plant. Physiol. 79: 311-314.
24. Datta N, L.Hardison and S.J.Roux. (1986). Polyamine estimation of protein phosphorylation in isolation pea nuclei. Plant. Physiol. 82: 681-684.
25. Dijk J and J. Littlechild. (1979). Purification of ribosomal proteins from *Escherichia coli* under nondenaturing conditions. Methods. Enzymol. 59: 481-502.
26. Dobrowolska G, E.Ber and G.Mosynska. (1986). Separation and purification of maize casein kinases by affinity chromatography. J. Chrom. 376: 421- 427.
27. Dobrowolska G, F.Meggio and A.L. Pinna. (1987). Characterization of multiple forms of maize seedlings protein kinases reminiscent of animal casein kinases (Typo 1) and TS (Typo 2). Biochem. Biophy. Acta. 931: 188-195.
28. Eil Ch and I.G.Wool. (1973). Phosphorylation of liver ribosomal proteins. Characteristics of the protein kinase reaction and studies of the structure of phosphorylated ribosomes. J.Biol.Chem. 248(14): 5122-5129.
29. Einspahr K.J and G.A Thompson Jr. (1990). Transmembrane signaling via phosphatidylinositol 4,5-biphosphate hydrolysis in plants. Plant. Physiol. 93: 361-366.
30. Elliot D.C and Y.S.Kokke. (1987). Cross reaction of a plant protein kinase with antiserum raised against a sequence from bovine brain protein kinase C regulatory subunit. Biochem.Biophy.Res.Comm. 145(3): 1043-1047.
31. Erdmann H, M.Bocher and K.G.Wagner. (1982). Two protein kinases from nuclei of cultured tobacco cells with properties similar to the cyclic nucleotide-independent enzymes (NI and NII) from animal tissue. Febs.Lett. 137(2): 245-248.
32. Erikson E and J.L.Maller. (1986). Purification and characterization of a protein kinase from *Xenopus* eggs highly specific for ribosomal protein S6. J.Biol.Chem. 261: 350-355.
33. Erikson L.R. (1991). Structure, expression and regulation of protein kinase involved in the phosphorylation of ribosomal protein S6. J. Biol. Chem. 266(10): 6007-6010.
34. Ettliger C and L.Lehle. (1988). Auxin induces rapid changes in phosphatidylinositol metabolites. Nature. 331(14): 176-178.

35. Fehling E and M. Weidner. (1988). Adaptative potential of wheat ribosomes toward heat depends on the large ribosomal subunit and ribosomal protein phosphorylation. *Plant. Physiol.* 87:562-565.
36. Friedmann M and B.W Poovaiah. (1991). Calcium and protein phosphorylation in the transduction of gravity signal in corn roots. *Plant. Cell. Physiol.* 32(2): 299-302.
37. Gehring C.A, H.R. Irving and R.W Parish. (1990). Effects of auxin and abscisic acid on cytosolic calcium and pH in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 9645-9649.
38. Gifroy S, M.D.Fricker, N.D Read and A.J. Trewavas. (1991). Role of calcium in signal transduction of *Commelia* guard cells. *Plant Cell.* 3: 333-344.
39. Gowdna S and D.T.N.Pillay (1980). Phosphorylation of ribosomal proteins by cyclic cAMP independent protein kinase. Ribosomal casein kinase from soybean cotyledons (*Glycine max* L). *Plant. Cell. Physiol.* 21(8): 1357-1365.
40. Guo Y-L and S.J. Roux. (1990). Partial purification and characterization of a calcium-dependent protein kinase from the green alga, *Dunaliella salina*. *Plant. Physiol.* 94: 143-150.
41. Hammet, J.R and J.L.Key. (1977). Studies on the phosphorylation of ribosomal proteins from soybean. *Plant. Physiol.* 59(Suppl): 107-109.
42. Hardie D.G. (1989). Protein phosphorylation and dephosphorylation. *Current Opinion in Cell Biology.* 1: 220-226.
43. Hanks S, A.M Quinn and T. Hunter. (1988). The protein kinase family: conserved feactures and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science.* 244: 42-54.
44. Harmon A.G, C.Putnam-Evans and M.J.Cormier. (1987). A calcium-dependent but calmodulin independent protein kinase from soybean. *Plant. Physiol.* 83: 830-837.
45. Hecht L.B and D.S.Straus. (1988). Insulin-stimulated protein kinase activity in rat skeletal muscle that phosphorylate ribosomal protein S6. *Biochem.Biophy.Res.Comm.* 152(3): 1200-1206.
46. Hershey J.W.B. (1989). Protein phosphorylation controls translation rates. *J.Biol.Chem.* 264(35): 20823-20826.

47. Hetherington A.M and A.Trewavas. (1984). Activation of a pea membrane protein kinase by calcium ions. *Planta*. 161:409-417.
48. Jeno P, I.M.Ballou, I.Novak-Hofer and G.Thomas (1988). Identification and characterization of a mitogen-activated S6 kinase. *Proc.Nat.Acad.Sci*. 85: 406-410.
49. Jergil B. (1972) Protein kinases from rainbow-trout testis ribosomes. Partial purification and characterization. *Eur. J. Biochem*. 28: 546-554.
50. Kanekatsu M, M.Dohke and K.Ohtsuki. (1991). Purification and characterization on three distinct protein kinases from *Marchantia polymorpha*. *Plant Cell Physiol*. 32(2): 159-168.
51. Keates R.A.B and A.Trewavas. (1974). Protein kinase activity associated with isolated ribosomes from peas and *Lemna minor*. *Plant.Physiol*. 54: 95-99.
52. Klucis E and G.M. Polya. (1987). Calcium-independent activation of two plant leaf calcium regulated protein kinases by unsaturated fatty acids. *Biochem.Biophys.Res.Comm*. 147(3): 1041-1047.
53. Klucis E and G.M.Polya. (1988). Localization, solubilization and characterization of plant membrane associated calcium dependent protein kinases. *Plant.Physiol*. 88: 164-171.
54. Krebs.E.G and J.A.Beavo. (1979). Phosphorylation - dephosphorylation of enzymes. *Ann.Rev.Biochem*. 48: 923-959.
55. Krebs E.G. (1983). Historical perspectives on protein phosphorylation and a classification system for protein kinases. *Phil.Trans.R.Soc.Lond*. 302: 3-11.
56. Krebs E.G. (1985). The phosphorylation of proteins: a major mechanism for biological regulation. *Biochem. Soc.Trans*. 13: 813-820.
57. Lador U.S and M.Zielinski. (1989). Protein kinase activities in tonoplast and plasmalemma membranes from corn roots. *Plant. Physiol*. 89: 151-158.
58. Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
59. Lake J.A. (1985). Evolving ribosome structure: domains in archaeobacteria, eubacteria, eocytes and eukaryotes. *Ann. Rev. Biochem*. 54: 507-530.

60. Lefkowitz R.J and M.G.Caron. (1990). The adrenergic receptor. En: Advances in second messenger and phosphoprotein research. A Raven Press New.York. E.U.A. ISBN 0-99167-670-5. 24: 1-9.
61. Levitan I.B, S.Chung and P.H.Reinchart. (1990). Modulation of a single ion channel by several different protein kinases. En: Advances in second messenger and phosphoprotein research. A Raven Press. New York. E.U.A. ISBN 0-88167-670-5. 24: 36-41.
62. Lewin B. (1987). *Genes III*. John Wiley and Sons. New York. pp: 150-152.
63. Li H, M. Dauwalder and S.J. Roux. (1991). Partial purification and characterization of a calcium dependent protein kinase from pea nuclei. *Plant. Physiol.* 96: 720-727.
64. Lin P and J.J.Key (1980). Histone kinase from soybean hypocotyls. *Plant. Physiol.* 66: 360-367.
65. Lin P. (1980). Phosphoprotein phosphatase of soybean hypocotyls. *Plant. Physiol.* 66: 368-374.
66. Lubben T.H and J.A Traugh. (1983). Cyclic nucleotide independent protein kinase from rabbit reticulocytes. Purification and characterization of proteasa-activated kinase II. *J. Biol. Chem.* 258: 13992-13997.
67. Lucantoni A and G.M.Polya (1987). Activation of wheat embryo calcium-regulated protein kinase by unsaturated fatty acids in the presence and absence of calcium. *Febs.Lett.* 221(1): 33-36.
68. McConnell W.P and N.D.Kaplan (1982). The activity of the acidic phosphoprotein from the 80S rat liver ribosome. *J. Biol.Chem.* 257: 5359-5366.
69. Mackintosh C and P.Cohen (1989). Identification of high levels of tipe I and tipe 2A protein phosphatases in higher plants. *Biochem.J.* 262: 335-339.
70. Mackintosh C, K.A. Beattie, S.Klumpp, P. Cohen and G.A.Codd. (1990). Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Lett.* 264(2): 187-192.
71. Mackintosh R. W, G. Haycox, D.G. Hardie and P.T.W. Cohen. (1990). Identification by molecular cloning of two cDNA sequences from the plant *Brassica napus* wich are similar to mammalian protein phosphatases 1 and 2A. *FEBS. Lett.* 276(1): 156-160.

72. Maller J.L. (1990). MPF and cell cycle control. En: Advances in second messenger and phosphoprotein research. A Raven Press. New York. E.U.A. ISBN 0-88167-670-5. 24: 323-327.
73. Marmé D. (1989). The role of calcium and calmodulin in signal transduction. En: Plant Biology. Vol.6. Second messenger in plant growth and development. Alan R.Liss Inc. New York E.U.A. ISBN 0-8451-1805-6 pp: 57-80.
74. Martiny-Baron G and G.F.E Scherer. (1989). Phospholipid stimulated protein kinase in plants. J.Biol.Chem. 264(30): 18052-18059.
75. Mooibroek M.J and J.H.Wang (1988). Integration of signal transduction processes. Biochem.Cell.Biol. 66:557-566.
76. Morrisey J and B.Hardesty. (1974). Assay and purification of the Met-tRNA hidrolasa from rabbit reticulocytes. Methods. Enzymol. 29: 726-728.
77. Murray M, J.T Guilfoyle and L.J Key. (1978). Isolation and characterization of a chromatin associated protein kinase from soybean. Plant. Physiol. 61: 1023-1030.
78. Muszynska G, G.Dobrowolska and B.Elzbieta. (1983). Polypeptides from maize seedlings with protein kinases functions. Biochem. Biophys. Acta. 757: 316-323.
79. Narand T and J.P.G. Ballesta. (1991). Phosphorylation controls binding of acidic protein to the ribosome. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88: 10563-10567.
80. Naslund P.H and T. Hultin. (1970). Effects of potassium deficiency on mammalian ribosomes. Biochem. Biophys. Acta. 204: 237-247.
81. Nomura M, A.Tissieres and Lengyel P. (1974). Ribosomes. Cold Spring Harbor Laboratory. United States of America. ISBN 0-87969-110-7 pp: 417-461, 855-871.
82. Olah Z and Z.Kiss (1986). Occurrence of lipid and phorbol ester activated protein kinase in wheat cells. Febs.Lett. 195: 33-37.
83. Pérez L, R.Aguilar and E.Sánchez de Jiménez. (1987). Effect of an auxin on maize tissue. Alteration of protein synthesis and phosphorylation. Physiol.Plantarum. 69: 517-522.
84. Pérez M.A. (1991). Fosforilación de proteínas ribosomales durante la germinación de maíz. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas (Bioquímica). Facultad de Química. U.N.A.M. pp: 64-66.

85. Petermann M.L. (1974). The dissociation of rat liver ribosomes by formamide: Extraction of a 5S RNA-protein complex. *Methods. Enzymol.* 30: 346-349.
86. Polya G.M and D.Jeffrey. (1982). Resolution of Calcium-calmodulin activated protein kinase from wheat germ. *Febs. Lett.* 130(1): 167-171.
87. Polya G.M and M.Vito (1984). Partial purification and characterization of a second calmodulin activated calcium dependent protein kinase from wheat germ. *Biochem.Biophy.Acta.* 785: 68-74.
88. Polya G.M and M.Vito (1985). Interaction of wheat germ calcium dependent protein kinases with calmodulin antagonists and polyamines. *Plant.Physiol.* 79: 968-972.
89. Polya G.M, E.Klucis and M.Haritou. (1987). Resolution and characterization of two soluble calcium dependent protein kinases from silver beet leaves. *Biochem. Biophy.Acta.* 931: 68-77.
90. Polya M.G and M.Haritou. (1988). Purification and characterization of two wheat embryo protein phosphatases. *Biochem. J.* 251: 357-363.
91. Pooviah B.W, A.S.N. Reddy and J.J. McFadden. (1987). Calcium messenger system: Role of protein phosphorylation and inositol biphospholipids. *Physiol. Plantarum.* 69: 569-573.
92. Putnam-Evans C, A.C. Harmon and J.M. Cormier. (1990). Purification and characterization of a novel calcium dependent protein kinase from soybean. *Biochem.* 29: 2488-2495.
93. Ramjoué H.P and J.Gordon (1977). Evolutionary microdivergence of chicken and rat liver ribosomal proteins. *J. Biol. Chem.* 252: 9065-9070.
94. Ranjeva R, G.Refeno, A.BouDET and D.Marmé. (1983). Activation of plant quinate: NAD oxidoreductase by calcium and calmodulin. *Proc. Natl. Acad.Sci.USA.* 80: 5222-5224.
95. Ranjeva R and A.M. BouDET. (1987). Phosphorylation of proteins in plants: regulatory effects and potential involvement in stimulus/response coupling. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 38: 73-93.
96. Rodríguez-Sotres R and Muñoz-Clares R.A. (1990). Kinetic evidence of the existence of a regulatory phosphoenolpyruvate binding site in maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. *Arch. Biochem. Biophy.* 276(1): 180-190.

97. Roskoski R. (1983). Assays of protein kinase. *Methods. Enzymol.* 99: 3-5.
98. Roux S.J, Y-L Guo and L.Halmin. (1990). Characterization of two calcium dependent protein kinase implicated in stimulus response coupling in plants. *Curr. Top. Plant. Biochem. Physiol.* 9: 129-140.
99. Rychlik W and Z. Wlodzimiers. (1980). Purification and characterization of adenosine-3', 5'-phosphate independent protein kinase from wheat germ. *Eur.J. Biochem.* 106: 653-659.
100. Saenz Robles M.T, M.Remacha, M.D. Vilella, S.Zinker and J.P.G. Ballesta. (1990). The acidic ribosomal proteins as regulators of the eukaryotic ribosomal activity. *Biochem. Biophys. Acta.* 1050: 51-55.
101. Saluja D, A. Bansal and R.C Sachar. (1987). Regulation of protein kinase through de novo enzyme synthesis in germinating embryos of wheat: enzyme purification and its autophosphorylation. *Plant. Science.* 50: 37-48.
102. Sathyanarayana R.A, R.Anjama, G. Shobha and D.Asis. (1987). Regulation of protein synthesis in plant embryo by protein phosphorylation. 83: 988-993.
103. Schafer A, B.F.M. Sybille and D.Marmé. (1985). Identification of a calcium and phospholipid dependent protein kinase in plant tissue. *Febs.Lett.* 187(1): 25-28.
104. Schaller G.E and M. Sussman. (1988). Phosphorylation of the plasmalemma H⁺ATPase of oat roots by a calcium stimulated protein kinase. *Planta.* 173: 509-518.
105. Scherer G.F.E and A. Bernadette. (1989). A rapid response to a plant hormone: auxin stimulates phospholipase A2 *in vivo* and *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 163(1): 111-117.
106. Sean J.C and G.Hind. (1986). Protein kinases of the thylakoid membrane. *J. Biol. Chem.* 261(30): 14062-14068.
107. Sharf K.D and L. Nover. (1982). Heat shock induced alterations of ribosomal protein phosphorylation in plant cell cultures. *Cell.* 30: 427-437.
108. Siegl G, C.Mackintosh and M. Stitt. (1990). Sucrose-phosphate synthase is dephosphorylate by protein phosphatase 2A in spinach leaves. *FEBS. Lett.* 270(1): 198-202.

109. Sikorski M, M.D Przybl, A.B.Legocki, W.Kudlicki, E.Gasior, J.Zalac and T.Borkowski. (1979). Ribosomal proteins of wheat germ. Distribution and phosphorylation *in vitro*. *Plant Physiol.* 59(Suppl): 177.
110. Smith R.D and J.C. Walker. (1991). Isolation and expression of a maize type 1 protein phosphatase. *Plant. Physiol.* 97: 677-683.
111. Smith T.A. (1985). Polyamines. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 36: 117-143.
112. Stein J.C, B.Howlett, D.C. Boyes, M.E. Nasrallah and J.B. Nasrallah. (1991). Molecular cloning of a putative receptor protein kinase gene encode at the self-incompatibility locus of *Brassica oleracea*. *Proc. natl. Acad. Sci. USA.* 88: 8816-8820.
113. Suzuki H and V.D. Pal. (1989). Nodule specific kinases phosphorylation nuclear factors in isolated nuclei. *Plant. Cell.* 1: 373-379.
114. Teulieres Ch, G.Alibert and R. Ranjeva. (1985). Reversible phosphorylation of tonoplast proteins involves tonoplast bound calcium-calmodulin dependent protein kinases and protein phosphatase. *Plant. Cell. Reports.* 4:119-201.
115. Torruella M, L.M.Casano and R.M. Vallejos. (1986). Evidence of the activity of tyrosine kinase(s) and of the presence of phosphotyrosine proteins in pea plantlets. *J. Biol. Chem.* 251(15): 6651-6653.
116. Traugh J.A, M.Mumby and R.Traut (1973). Phosphorylation of ribosomal proteins by substrate specific protein kinases from rabbit reticulocytes. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 70(2): 373-376.
117. Trewavas A.(1973). The phosphorylation of ribosomal protein in *Lemna minor*. *Plant Physiol.* 51: 760-767.
118. Veluthambi K and B.W Poovaiah. (1984). Calcium and calmodulin regulated phosphorylation of soluble and membrane proteins from corn coleoptiles. *Plant. Physiol.* 76: 359-365.
119. Veluthambi K and B.W Poovaiah. (1984). Polyamine stimulated phosphorylation of proteins from corn (*Zea mays L*) coleoptiles. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 122(3): 1374-1380.
120. Ventimiglia F.A and I.G Wool. (1974). A kinase that transfers the γ -phosphoryl group of GTP to proteins of eukaryotic 40S ribosomal subunits. *Pro. Nat. Acad. Sci.* 71(2): 350-354.

121. Viale. A.M, J. Ngrenprasirtsiri and T.Akazawa. (1991). Characterization and intraorganellar distribution of protein kinases in amyloplast isolated from cultured cells of sycamore (*Acer pseudoplatanus* L). *Plant Physiol.* 96: 1142-1149.
122. Vidales J.F, M.T. Saenz-Robles and J.P.G Ballesta. (1984). Acidic proteins of the large ribosomal subunit in *Saccharomyces cerevisiae*. Effect of phosphorylation. *Biochem.* 23: 390-396.
123. Walker. J.C and R.Zhang. (1990). Relationship of a putative receptor protein kinase from maize to the locus glycoproteins of *Brassica*. *Nature.* 345: 743-746.
124. Weiel J.E, G.N Ahn, R. Seger and E.G Krebs (1990). Communication between protein tyrosine and protein serine/threonine phosphorylation. En: *Advances in second messenger and phosphoprotein research.* A Raven Press. New York. ISBN 0-88167-670-5. 24: 182-195.
125. Witters L.A. (1990). Protein phosphorylation and dephosphorylation. *Current Opinion in Cell Biology.* 2: 212-220.
126. Wool I.G (1979). The structure and function of eukaryotic ribosomes. *Ann. Rev. Biochem.* 48: 719-754.
127. Yakovleva L.A and O.N. Kulaeva (1987). The effect of phytohormones on phosphorylation of ribosomal proteins in detached pumpkin cotyledons. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* 182: 359-365.
128. Yan J.T.F and M. Tao. (1982). Purification and characterization of a wheat germ protein kinase. *J. Biol. Chem.* 257(12): 7037-7043.
129. Yan J.T.F and M. Tao (1982). Studies on an endogenous substrate of wheat germ protein kinase. *J. Biol. Chem.* 257(12): 7044-7049.
130. Zocchi G. (1985). Phosphorylation-dephosphorylation of membrane proteins controls the microsomal H⁺-ATPase activity of corn roots. *Plant Science.* 40: 153-159.