



ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

IZTACALA - U.N.A.M.
Carrera de Biología

CARACTERIZACION "IN VITRO" DE LA
ACTIVIDAD SUPRESORA DE LA
TRANSCRIPCION EN EL HUESPED,
PRESENTE EN EL EXTRACTO
CITOPLASMATICO DE CELULAS HeLa
INFECTADAS CON EL VIRUS DE LA
POLIOMIELITIS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O
P R E S E N T A :

DEBORAH LAZARD SALTIEL





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se realizó en el
Centro de Investigación y Estudios
Avanzados del Instituto Politecnico
Nacional.

A mis padres

A Marcos

Quiero hacer constar mi agradecimiento al Dr. Carlos Fernández Tomás, mi tutor, por su apoyo e interés por mi desarrollo y formación profesional.

A mis compañeros, mis amigos , en
especial a Alejandra, Lilia y Fransisco,
sin los cuales este trabajo no hubiera
sido posible.

INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	4
1.EL VIRUS DE LA POLIO.....	4
a.Inhibición de las funciones celulares por el virus de la poliomeilitis.....	11
2.EXPRESION DE GENES EUCARIOTES.....	16
a.Sitios en el DNA importantes para la iniciación especifica dependiente de RNA polimerasa II.....	16
b.Factores celulares que intervienen en la transcripción dependiente de la RNA polimerasa II.....	21
c.RNA polimerasa II.....	24
d.Transcripción "in vitro" dependiente de RNA polimerasa II.....	27
OBJETIVO.....	30
ESTRATEGIA.....	31
MATERIALES.....	32
METODOS.....	41
RESULTADOS.....	54
DISCUSION.....	89
BIBLIOGRAFIA.....	96

LISTA DE FIGURAS

1. REPLICACION DEL VIRUS DE LA POLIO.....	7
2. MAPA DEL PROCESAMIENTO DE LAS PROTEINAS DEL VIRUS DE LA POLIOMELITIS.....	10
3. SITIOS EN EL DNA Y FACTORES CELULARES INVOLUCRADOS EN LA TRANSCRIPCION DEPENDIENTE DE LA RNA POLIMERASA II.....	26
4. PILOTO DE INFECCION CON POLIO.....	55
5. MAPA DE PLAX.....	58
6. PATRON DE RESTRICCION DE PLAX.....	59
7. ENSAYO DE INICIACION ESPECIFICA DE LA TRANSCRIPCION DEPENDIENTE DE DNA EXOGENO Y DE RNA POLIMERASA II.....	61
8. TRANSCRIPCION IN VITRO EN PRESENCIA DE ECTi.....	63
9. TRANSCRIPCION ENDOGENA Y EN PRESENCIA DE DNA EXOGENO DE EXTRACTOS CITOPLASMATICOS (EC).....	67
10. EFECTO DE LOS EXTRACTOS CITOPLASMATICOS SOBRE LA TRANSCRIPCION ESPECIFICA DEL PROMOTOR TARDIO DE ADENO-2.....	71
11. PREINCUBACIONES CORTAS CON LOS EXTRACTOS CITOPLASMATICOS.....	76
12. PREICUBACION DE LOS EXTRACTOS CITOPLASMATICOS POR TIEMPOS LARGOS.....	79
13. TRANSCRIPCION IN VITRO EN NUCLEOS	

PURIFICADOS.....83

14. PREINCUBACION DE LOS NUCLEOS CON LOS EXTRACTOS
CITOPLASMATICOS.....87

LISTA DE TABLAS

I. TRANSCRIPCION ESPECIFICA CATALIZADA "IN VITRO" POR LOS EXTRACTOS CITOPLASMATICOS.....	68
II. EFECTO DE LOS EXTRACTOS CITOPLASMATICOS SOBRE LA TRANSCRIPCION MEDIADA POR EL EXTRACTO CELULAR TOTAL.....	72
III. EFECTO DE LA PREINCUBACION DE LOS EXTRACTOS CITOPLASMATICOS CON EL TEMPLADO SOBRE LA TRANSCRIPCION ESPECIFICA DEL EXTRACTO CELULAR TOTAL.....	80
IV. TRANSCRIPCION "IN VITRO" DEPENDIENTE DE RNA POLIMERASA II EN NUCLEOS PURIFICADOS.....	84
V. EFECTO DE LA PREINCUBACION DE LOS NUCLEOS CON LOS EXTRACTOS CITOPLASMATICOS.....	88

RESUMEN

La infección de células de mamífero con el virus de la poliomielitis, produce un abatimiento en la síntesis de RNAm de las mismas (Baltimore y Franklin 1962).

Evidencias en la literatura sugieren que el efecto se da a nivel de iniciación (Crawford y cols. 1981; Flores-Otero y cols. 1982).

Se ha reportado la presencia de un inhibidor en extractos citoplasmáticos provenientes de células infectadas con el virus de la poliomielitis (Baladin y Franklin 1964; Bossart y cols. 1982).

En este trabajo, utilizamos tales extractos, para determinar, si es posible caracterizar la actividad inhibitoria presente en los mismos, en un sistema de transcripción "in vitro", que consta:

a) Del promotor tardío de Adenovirus-2, clonado en el plásmido pBR322. La transcripción a partir de este promotor hasta el sitio Taq I, da como resultado un RNA de 560 bases.

b) De extractos celulares crudos de células HeLa, que contienen a la RNA polimerasa II y los factores necesarios para la iniciación específica.

Al ensayar en nuestro sistema, diferentes concentraciones proteicas de extracto citoplasmáticos provenientes de células infectadas, no se detecto, en esta fracción subcelular, la presencia de un inhibidor de la transcripción específica. Asi

mismo, no se reprodujo el efecto inhibitorio al preincubar los extractos citoplasmáticos infectados con el templado por diferentes longitudes de tiempo. Sin embargo, al preincubar los mismos con núcleos aislados de células HeLa (Flores-Otero y cols. 1982), encontramos una inhibición del 85-100% en la síntesis de RNAm de los mismos.

Por lo que existen diferencias entre el sistema de transcripción "in vitro" dirigido por el promotor tardío de Adeno-2 y el sistema de núcleos, que permiten o no la actividad del inhibidor; entre éstas proponemos:

1. Que el inhibidor no se encuentre en forma activa en las condiciones de ensayo del sistema de transcripción "in vitro", dirigido por el promotor tardío de Adeno-2.

2. Que se requiera de la estructura cromatinica para que el inhibidor sea activo, dado que el blanco de la inhibición puede ser proteína(s) que requiera estar formando parte de dicha estructura.

Considerando, que la subespecie de la RNA polimerasa II que se ha encontrado unida a cromatina activa en transcripción, es la II₀ (García-Carranca y cols. 1984); que la misma, es modificada en células infectadas por polio con una cinética idéntica a la de la inhibición de la transcripción (Rangel y cols. enviado para su publicación); y que no se encuentra en el extracto celular crudo (utilizado en nuestros ensayos), pero si en forma mayoritaria en los núcleos (Velazquez y Rangel comunicación personal).

sugerimos: Que la actividad inhibitoria presente en los extractos citoplasmáticos provenientes de células infectadas, tiene como blanco de acción a la RNA polimerasa II y que al no estar presente ésta en el extracto crudo, no fue posible detectar su actividad.

EL VIRUS DE LA POLIOMIELITIS.

El virión del virus de la poliomielitis está constituido por una cápside de forma icosaédrica, compuesta de 60 subunidades, cada una de las cuales presenta 4 proteínas: Vp1, Vp2, Vp3 y Vp4; y de una cadena sencilla de RNA de polaridad positiva (igual a la del RNAm), de 7500 nucleótidos y de peso molecular de 2×10^6 daltones (Baltimore 1969). En su extremo 3' presenta un residuo de 75 adenosinas aproximadamente (Armstrong y cols. 1972) y su extremo 5' consiste de un pUp unido en forma covalente en su extremo 5' a una proteína de bajo peso molecular denominada VPg (Flanegan y cols. 1977). Por lo cual, este RNA difiere en el extremo 5' de los RNAm celulares que contienen un residuo metilado de guanina.

El ciclo lítico de polio contempla 4 fases ó estadios: adsorción y penetración, fase de eclipse, expresión viral y morfogenesis del virión.

En el virus, cada una de las 60 subunidades de la cápside son potencialmente capaces de unirse a un receptor celular y parece ser que es Vp4 (P1a en la nomenclatura L434, Ruckert y Wimmer, 1984) la proteína involucrada en dicha unión (Briendl, 1971b). Aunque los receptores celulares no estén bien caracterizados, son altamente específicos y parecen estar conformados por lipoproteínas y glicoproteínas (Lönberg-Holm, 1975; Krahl y Crowell, 1982). La unión virus-célula es esencialmente completada después de los 15 minutos de

interacción, siendo independiente de temperatura (Davis y cols 1980) y afectada por la concentración iónica y el pH del medio (Holland y McLeren 1959).

Tras la unión a la superficie de la célula receptora, el virus sufre una serie de modificaciones, caracterizadas por 1) pérdida de la proteína de la capsida P1a 2) una moderada disminución en su coeficiente de sedimentación y 3) pérdida de infectividad, aunque la partícula aún contiene un genoma funcional (Ruckert, 1976). Se han sugerido por experimentos realizados "in vitro", que estadios posteriores de modificación involucran procesos mediados por la membrana (Madhus, y cols. 1984; Zeichhdart y cols 1985), el desnudamiento se da en forma concomitante a la penetración del virión por viropexis (Luria y cols. 1978) y es dependiente de temperatura (Davis y cols. 1980).

Tras la penetración del virión a la célula huésped se inicia el estadio denominado de eclipse, en el que las funciones celulares tales como la transcripción y traducción son inhibidas (ver más adelante); se denomina estadio de eclipse por que en este momento no existen viriones con capacidad infectiva en la célula.

En el caso de polio la transcripción y replicación son el mismo proceso ya que el resultado final de ambas es RNA de una sola cadena y de polaridad positiva. Para lograr esto, el primer paso requerido es la formación de una cadena complementaria de RNA de polaridad negativa (Baltimore

1967)[Ver figura 1]. Se han identificado dos actividades de la RNA polimerasa dependiente de RNA codificada por el virus: La primera copia heteropolimeros, con alguna preferencia por el genoma de polio y la segunda funcionando sólo en el caso de formación de cadenas negativas a partir de cadenas positivas, con actividad de poli(U)polimerasa, aunada, ésta, a un factor de origen celular (Dasgupta y cols. 1980; Baron y Baltimore 1982 a y b; Van Dyke 1982 y Dasgupta 1983a), el cual parece estar involucrado en iniciación ya que puede ser substituido agregando una cadena de oligo U al sistema (Dasgupta y cols. 1980). Se ha encontrado que este factor celular es una proteína de 67kd capaz de autofosforilarse regulado por la presencia de dobles cadenas de RNA en el sistema. Se ha observado que esta proteína es capaz de fosforilar al factor de iniciación de la traducción en eucariotes Ie-F2 (Morrow y cols 1985). La cadena de RNA naciente tendrá en su extremo 5' un residuo unido a la proteína VPg, unión que requiere de ATP (Takegami y cols. 1983) [Ver figura 1].

Esta cadena de RNA junto con la RNA polimerasa conformará el intermediario replicativo (Baltimore y Girard 1966), en el cual se sintetizan las cadenas con polaridad positiva (Baltimore 1967; Oberg y Philipson 1971; Thach y cols. 1974 Luria y cols. 1976). [Ver figura 1].

La única diferencia entre el RNA_m y el RNA genómico es que, al recuperar el mensajero del polirribosoma no se encuentra VPg unida al extremo 5'.

FIGURA 1. REPLICACION DEL VIRUS DE LA POLIOMELITIS. El genoma del virus de la poliomyelitis, consiste de una molecula de RNA+ de aproximadamente 7,500 bases, el cual tiene unida en su extremo 5' una proteina de origen viral denominada VPg y en su extremo 3' una cadena de poli-A. Tanto la replicación como la transcripción del mismo dan lugar a una cadena de RNA de polaridad positiva. El proceso consta de los siguientes pasos: La cadena de RNA+ da lugar a una cadena de polaridad negativa por la actividad de una RNA polimerasa codificada por el virus, ahunada esta, a un factor de origen celular; a partir de éste RNA y por la acción de la misma RNA polimerasa se sintetizan en forma continua cadenas de RNA+, a este complejo se le denomina "Intermediario Replicativo".

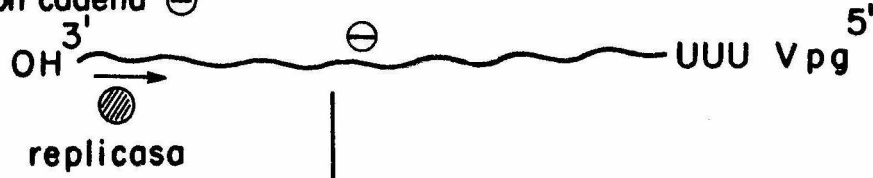
GENOMA DEL VIRION

Transcripción cadena \oplus

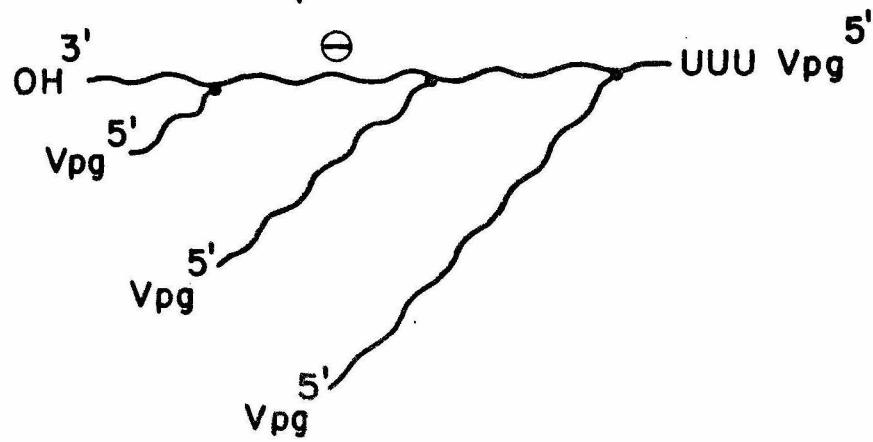


replicasa + factor del huesped

Transcripción cadena \ominus



replicasa



Las proteínas de polio son sintetizadas en polirribosomas muy largos(300S), conteniendo de 35 a 40 ribosomas por unidad (Luria y cols 1976).

El RNAm es un mensajero monocistrónico, que se traduce a una poliproteína de 200,000daltones denominada NCVP-00(Jacobson y cols. 1970). Esta poliproteína da lugar a todas las proteínas funcionales del virus. La mayoría de dichos procesamientos son producto de un rompimiento proteolítico entre los residuos (glutamina-glicina), producido por una proteasa codificada por el virus "P3-7c (Kitamura y cols. 1981)(3C nomenclatura L434; Ruckert y Wimmer, 1984). Hasta ahora la información sobre el procesamiento es la siguiente: la poliproteína se procesa a tres productos primarios: P1, P2 y P3 (Kitamura y cols. 1981) [Ver figura 2].

1. El precursor P1a

Este polipéptido, es el precursor de las cuatro proteínas estructurales VP1 a VP4 (P1a a P1d nomenclatura L434; Ruckert y Wimmer, 1984). El procesamiento se lleva a cabo en dos etapas, originandos primero la proteína de la procápside VP0 (P1ab) y las de la cápside VP1 (P1d) y VP3 (P1c) (Jacobson y Baltimore 1968);posteriormente la proteína VP0 da lugar, mediante un corte en los residuos aspargina-serina, a las proteínas de la cápside VP2 y VP4(Jacobson y cols. 1970).

2. El precursor P2abc

El corte entre P1a y P2abc se produce entre los residuos de tirosina-glicina, por la acción de la proteasa propia 2a (Toyoda y cols. 1986). El precursor P2abc da lugar, por procesamiento, a las proteínas P2a y P2bc, y esta última a su vez, da lugar a las proteínas P2b y P2c, de función desconocida (Pallansch y cols. 1984).

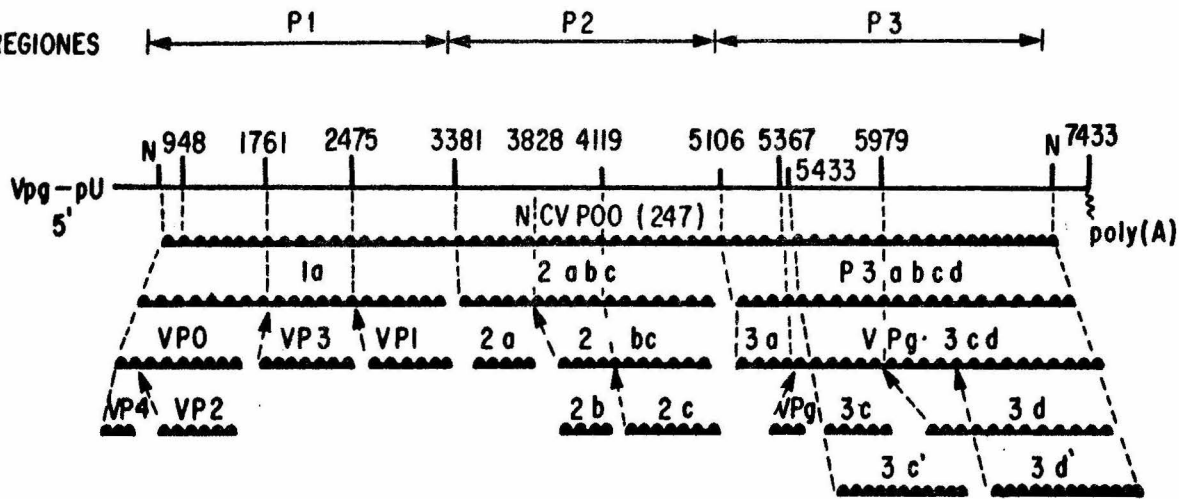
3. El precursor P3abcd.

Hasta donde se sabe del complejo procesamiento de este precursor es que, a partir de P3abcd se produce P3cd a partir de la cual se procesan P3d la cual es la precursora de la polimerasa (Semler y cols. 1983), de la proteína VPg, la cual se une covalentemente al extremo 5' del RNA genómico (Flanegan y cols. 1977), P3c que es la proteasa con actividad autocatalítica (Hanecak 1984) y P3-3a que no se sabe su función; por un procesamiento alternativo P3cd puede dar lugar a P3c' y P3d' (Pallansch y cols. 1984) de función desconocida.

Una vez expresado el genoma viral, se forma el precursor protéico de la partícula madura: la procápside (Jacobson y Baltimore 1968) que al asociarse a una molécula de RNA⁺ pasa a formar el pro-virión (Fernández Tomás y Baltimore 1973).

FIGURA 2. MAPA DEL PROCESAMIENTO DE LAS PROTEINAS DEL VIRUS DE LA POLIOMELITIS. El RNA del virus de la poliometitis se ha dividido en tres regiones para su estudio: P1, P2 y P3. El RNA se traduce en una poliproteina que posteriormente se procesa para dar lugar a todas las proteínas del virus. De función conocida son VP1, VP2, VP3 y VP4 (proteínas de la capsida); 2a y 3c (proteasas); VPg (proteína unida en forma covalente al extremo 5' del RNA del virion) y 3d (forma parte de la RNA polimerasa). (Ruckert y Wimmer, 1984).

REGIONES



RNA ———
PROTEINAS ———

Esta moléculas, mediante el procesamiento de VP0 a VP2 y VP4 se convierte en el virión maduro e infectivo.

Inhibición de las funciones celulares por el virus de la poliomielitis.

1. Inhibición de la Traducción Celular.

La inhibición en la incorporación de aminoácidos radioactivos a las proteínas celulares se detecta dentro la primera hora después de la infección, alcanzando un máximo alrededor de las tres horas. Para que se lleve a cabo dicha inhibición no se requiere la expresión del genoma viral (Bablanian, 1972).

En la actualidad, son tres las posibles causas que se aceptan para explicar este fenómeno:

a.-Existe evidencia que propone la inactivación, por la infección viral, del complejo de iniciación (CBP), que reconoce al residuo de 7mG ppp (cap) en eucariotes (Rose y cols. 1978; Ehrenfeld, 1982). La inactivación aparentemente se produce por la degradación de un polipéptido de 220kd que forma parte del complejo. La degradación, aparentemente se lleva a cabo en forma indirecta por la proteasa 2a (Emini y cols. 1984 y Bernstein y cols. 1985) .

b.-En experimentos de traducción "in vitro", se encontró que a altas concentraciones de K⁺ se favorece la traducción viral y se inhibe la celular (Saborio y cols 1974). Ha sido posible

detectar que la infección con polio, produce cambios en la permeabilidad de la membrana celular, acumulándose iones monovalentes, como el sodio en el interior de la célula (Nair, 1984). Se ha propuesto que este cambio osmótico inhibe la traducción celular y favorece la viral (Carrasco y Smith 1976; Alonso y Carrasco 1981; Sanchez-Trujillo).

c.-La última hipótesis expuesta hasta la fecha para explicar el fenómeno de la inhibición de la traducción propone la asociación de proteínas virales a ribosomas y su subsecuente modificación. Steiner-Pryer y Cooper (1973) aislaron mutantes de polio defectivas en la inhibición de la traducción. Todas las mutaciones se localizaron en la zona del genoma del virus que codifica para la cápside. De acuerdo a esto se propuso el modelo del ecuestrón, esto es, la unión específica de proteínas virales a la subunidad ribosomal 40s, con lo que se facilita la unión del RNA_m viral al ribosoma. En células infectadas con poliovirus, las proteínas que cosedimentan con la subunidad ribosomal 40s son VP0, VP1 y VP3 todas ellas proteínas estructurales de la procápside (Wright y cols. 1974). En el laboratorio Cantero-Aguilar (Virology en prensa) encontró marca proveniente de proteína estructural del virión asociada a polisomas desde tiempos tempranos de infección (proteína no sintetizada "de novo") y por otro lado Arevalo-Gallegos y cols. (enviado para su publicación), encontraron a tiempos tardíos de infección, a las proteínas, VP1, VP2 y VP3, asociadas a polisomas activos en traducción

viral.

2. Inhibición de la transcripción dependiente de la RNA polimerasa II.

En 1962, Baltimore y Franklin encontraron que la infección de células L de ratón con picornavirus da lugar a la inhibición de la transcripción celular.

Dicha inhibición no es el resultado de un incremento en la velocidad de degradación del RNA_m (Colby y cols. 1974), así como tampoco es debida a una alteración en la estructura o actividad de la RNA polimerasa II solubilizada (subespecies IIa y IIb) (Shwartz 1974; Aprilletti y Penhoet 1974; Aprilletti y Penhoet 1978). Sin embargo ha sido reportado que la subespecie unida a cromatina es la IIo (García-Carranca, y cols. 1984). Estudios recientes en el laboratorio (Rangel y cols. enviado para su publicación), han demostrado que tras la infección con polio, la RNA polimerasa IIo se ve modificada con una cinética idéntica a la de la inhibición de la transcripción.

Aprilletti (1978), ensayó la transcripción tanto de un templado control como de un infectado y encontró que la RNA polimerasa II era capaz de transcribir de forma inespecífica a partir de ambos templados, de lo cual se deduce que el templado no ese encuentra modificado.

Por otro lado, utilizando el detergente Sarkosyl, el cual

tiene la propiedad de eliminar las proteínas unidas al templado e inactivar la RNA polimerasa soluble (Green y cols. 1975), pero que respeta a aquella polimerasa que ha iniciado cadenas de RNA "in vivo" (Gariglio y cols. 1974; Gariglio 1976), se encontró que a las 2 horas post-infección, el número de RNA polimerasas unidas al templado había disminuido en un 50% (Flores-Otero y cols 1982). El anterior resultado junto con los antecedentes mencionados hasta ahora, llevan a considerar a la iniciación, como el evento en el cual polio inhibe la transcripción.

Crawford y cols. en 1981 encontraron que un extracto celular total ECT (Manley y cols. 1980), proveniente de células HeLa infectadas con poliovirus, es incapaz de transcribir específicamente "in vitro", pero si a este extracto se le adiciona extracto S-100 (conteniendo factores celulares necesarios para la transcripción) proveniente de células HeLa no infectadas, la transcripción específica se restaura. Este resultado sugiere la deficiencia en algún factor requerido para la iniciación específica en el extracto proveniente de células infectadas; además del experimento anterior, se hicieron ensayos de transcripción mezclando extractos infectados y control, obteniéndose transcripción específica. Esto sugiere la ausencia o inactividad de un inhibidor en los extractos.

Por otro lado se ha sugerido la presencia de un inhibidor en los extractos citoplasmáticos provenientes de células

infectadas con Mengovirus, ya que el incubarse con núcleos aislados de células no infectadas, se inhibe la síntesis de RNA (Baladin y Franklin 1964). Bossart y cols. (1982), encontró que un extracto citoplasmático, aislado de células infectadas con poliovirus inhibe la síntesis de RNAm, ensayada en núcleos de células HEP-2 no infectadas. La inhibición detectada, tanto "in vitro" como "in vivo" coincide con la acumulación de proteína viral en el núcleo (Blenz y cols. 1982; Fernández-Tómas. 1982; Bossart y cols. 1984).

En el laboratorio (Núñez 1984), encontro una proteína de alrededor de 35,000 daltones que se acumula en núcleo y citoplasma durante la infección con poliovirus y que aparentemente tiene afinidad por la cromatina.

EXPRESION DE GENES EUCARIOTES.

Los organismos eucariotes presentan un vasto acervo genético, siendo así, llegan a tener 1000 veces más la cantidad de DNA de un organismo procariote y pueden expresar alrededor de 50,000 genes a diferencia de 3,000 expresados en *E. coli* (Bradbury y cols. 1981).

La regulación de la expresión genética es complicada y ocurre a varios niveles, uno de los más importantes es la iniciación de la transcripción, ya que éste es el evento en el que se determina la producción o no del RNAm de muchas proteínas. Es por esto que desde los esbozos de la Biología Molecular, los investigadores se han avocados a tratar de entender los elementos involucrados en este evento, como serían, secuencias específicas en el DNA, RNA polimerasas y factores celulares.

Dado que en este trabajo se abordó el efecto de la infección viral sobre la iniciación de la transcripción, a continuación se discutirán los elementos regulatorios involucrados en el proceso.

1. Sitios en el DNA importantes para la iniciación específica dependiente de RNA polimerasa II.

El desarrollo de nueva tecnología, como la secuenciación

de ácidos nucleicos, la mutagenésis "in vitro" y la ingeniería genética, han permitido localizar secuencias específicas y relacionarlas, funcionalmente, con la iniciación específica de la transcripción.

a.- La caja TATA

Se encuentra a -32 pb del sitio de iniciación de la cadena de RNA. Es indispensable para que se lleve a cabo la iniciación específica de la transcripción (Wasylyk y cols. 1980b; Mathis y Chambon 1981; Hu y Manley 1981 y Lee y cols. 1982), ya que parece ser la responsable de situar a la RNA polimerasa II en el sitio correcto para iniciar específicamente (Bensimhow 1983).

En los promotores en los que no ha sido posible detectar una caja TATA, se sigue llevando a cabo la transcripción específica a partir del sitio +1. Tal es el caso de varios genes virales como serían los genes tempranos de Adenovirus-2 E2 y IV2 y el promotor tardío de SV-40. En este último se ha localizado una secuencia substituta de 11pb que va de -21 a -30pb, la cual funciona como señal de inicio (Brady y cols. 1982).

b.- Las repeticiones de 21pb y la caja CAAT

En el promotor temprano del virus SV-40, entre -100 a -40pb del sitio de iniciación, se encuentran tres repeticiones de 21pb cada una de ellas con dos secuencias ricas en G-C. Esta secuencia ha demostrado jugar un papel importante en la determinación de la cantidad de RNA sintetizado tanto, "in vivo" como "in vitro", ya que parece facilitar el reconocimiento de la caja TATA. Ha sido sugerido que esta región actúa en forma independiente, en la transcripción del promotor temprano (Everett u cols. 1983) como del promotor tardío (Baty y cols 1984; Mishoe y cols. 1984). Mishoe y cols (1984), a través de la construcción de plásmidos recombinantes, encontraron que al separar las regiones de 21pb de otras secuencias promotoras de SV40, la transcripción se lleva a cabo en secuencias substitutas y en forma bidireccional. Lo que sugiere un posible papel activador de esta región.

Por otro lado se ha encontrado en los virus de Epstein-Barr (Farrel y cols. 1983) adenovirus-2 (Hen y cols. 1982; Jove y Manley 1984), en el gene para la ovalbúmina (Benoist y cols. 1980) y fibroína (Tsuda y Susuki 1981), una región con la secuencia consenso 5'GGCCAATCT (caja CAAT), localizada de -70 a -50pb del sitio de iniciación. Esta región parece tener relación con al activación de la RNA

polimerasa II (Bensimhow 1983).

c. Secuencias estimuladoras o "enhancers".

Un tercer tipo de secuencias importantes para la regulación de la transcripción son las secuencias estimuladoras (SE) (Bensoit y Chambon 1981). Se encontraron por primera vez en virus animales como son Adenovirus-2 (Hearing y Shenk 1983) y SV40 (Benoist y Chambon 1981). Este último conformado por la repetición de 72 pb, localizadas entre las bases -1143 a -257, por lo menos una de éstas dos secuencias es necesaria para la transcripción de los genes tempranos de SV40 (Byrne y cols 1983).

Las SE son secuencias capaces de incrementar la magnitud de la transcripción varias veces, sin importar la orientación ó posición de la misma.

Moreau y cols. (1984b) encontraron que la SE de SV40 era capaz de incrementar la transcripción, aun al ser clonados en plásmidos que contenían los promotores tardíos de Ad-2 ó de conalbumina; siendo este incremento independiente a la orientación de la SE pero sí sensible a la distancia del sitio +1.

Por otro lado Wasylyk, en 1983, encuentra que, si los elementos promotores están ausentes ó son mutados, las SE promueven la transcripción a partir de secuencias substitutas

que sólo funcionan si el estimulador está presente. Estos autores proponen a las repeticiones de 72pb como el sitio de entrada a la RNA polimerasa II, ya que la SE de SV-40 incrementa el número de RNA polimerasas asociadas (Treisman y Maniatis 1985 y Weber y Schaffner 1985). La RNA polimerasa viajará en ambas direcciones hasta encontrar una secuencia promotora a la cual pueda reconocer; la polimerasa tendrá preferencia por esta zona y concomitantemente esta zona tendrá un arreglo espacial especial dentro del templado, a través de la inducción del desnudamiento de la zona promotora (Jongstra y cols. 1984); este arreglo bien se puede dar por la interacción diferencial con factores del huésped (Laimins cols 1982).

Se han encontrado SE en genes celulares como en la cadena pesada de las inmunoglobulinas ó en los genes inducibles por calor de *Drosophila* (Pelham 1982). También se han encontrado en retrovirus, en el virus de tumor mamario de ratón MMTV (Hageer y cols. 1983), el virus del sarcoma de Rous RSV (Capecchi y cols. 1983) ó el virus de sarcoma murino de Moloney Mo-MSV (Verma y cols. 1983).

Es importante hacer notar que todos los experimentos funcionales para las SE se han hecho "in vivo". Sólo en un caso se ha reportado la estimulación de la transcripción "in vitro" donde no se encontraron muchas de las características reportadas (Sassone Corsi y cols. 1984), tal como la estimulación a distancia.

2.- Factores Celulares que Intervienen en la Transcripción dependiente de la RNA polimerasa II.

En los primeros intentos de establecer un sistema de transcripción "in vitro", utilizando un templado suplementado con RNA polimerasa II, quedó de manifiesto que dichos componentes no eran suficientes para lograr la iniciación específica; dicha especificidad se encontró al incluir en la reacción extractos celulares relativamente crudos (Manley y cols. 1980; Weil y cols 1979b).

En 1980 Matsui y cols., a partir del extracto celular proveniente de células humanas KB-S100(capaz de realizar transcripción específica "in vitro" dependiente de RNA polimerasa exógena), realizaron un fraccionamiento del mismo en fosfocelulosa, DEAE- celulosa y DNAcelulosa. Por otro lado Samuels y cols. (1982) hicieron un fraccionamiento similar de un extracto completo de células HeLa (extracto de Manley). Ambos encontraron cuatro fracciones las cuales eluyen en ambos casos en el volumen muerto, 0.6 y 1M del fraccionamiento con fosfocelulosa y que contienen los elementos necesarios para que se lleve a cabo la transcripción específica. En ambos casos se encontró que una de las fracciones que eluye en 0.6M inhibe la transcripción inespecífica ;posteriormente la identificaron como la

proteína poli(ADP)ribosa, la cual tiene una actividad enzimática que repara cortes de una sola cadena (Nicks). Por otro lado, se sabe que la RNA polimerasa II es capaz de iniciar transcripción inespecífica en dichos sitios de corte o "nicks" (Roeder 1976), con lo que la poli(ADP)ribosa podría inhibir la iniciación inespecífica eliminando los "nicks" que existieran en el templado (Slattery y cols 1983).

A partir de células de tumor ascítico de Ehrlich, se ha purificado un factor proteico de 40,000 daltones denominado S-II, el cual estimula la transcripción dependiente de RNA polimerasa II "in vitro" (Sekimizu y cols 1979; Sekimizu y cols 1981). Al agregar anticuerpos contra S-II en núcleos aislados de células de tumor ascítico de Ehrlich, o en un lisado de células HeLa, se encuentra que es selectivamente inhibida la transcripción sensible a amanitina (Sekimizu y cols 1981; Ueno y cols. 1981), lo cual hablaría de la posible interacción del factor S-II con la RNA polimerasa II.

Recientemente Horikoshi (1984) describió la formación de un complejo entre la RNA polimerasa II y el factor S-II, el cual se presenta aun en la ausencia de DNA ó nucleótidos, aunque, en presencia de éstos, dicho complejo es mucho más estable; Horikoshi(1984) también encontró que este complejo perdura a través de la elongación.

La función exacta del factor S-II aun no se conoce, pero se sabe que la RNA polimerasa II es capaz de transcribir "in vitro" en ausencia del factor (Roeder 1976), por lo que se

creo que no tiene función de enzima catalítica.

Hasta ahora, se han encontrado que todas las regiones importantes en los promotores tienen interacciones con factor(es) de la célula. Siendo así, Davison, en 1983, encontró un factor a partir de un extracto crudo (Manley y cols 1980), el cual interactúa con la caja TATA (del promotor tardío de Ad-2 oNM del promotor del gene de la conoalbúmina), formando un complejo en ausencia de la RNA pol II, el cual es necesario pero no suficiente (ya que al utilizar secuencias similares a la caja TATA, se da lugar a la formación del complejo, pero no así a la transcripción específica) para que se lleve a cabo la transcripción específica. Algunas de las propiedades de este factor son muy semejantes a las de la proteína actina (Egly y cols. 1984).

Por otro lado, Dynan y Tjian (1983 a y b) a partir de un fraccionamiento de células HeLa, reportaron un factor proteico (Sp1) el cual interactúa en forma específica con la región de repetición de 21pb en el promotor temprano del virus SV40; dicha proteína ha demostrado ser un elemento necesario para la activación de dicho promotor. Los autores proponen un modelo para explicar esta activación, en el cual, la región de repeticiones de 21pb junto con el factor Sp1 unido en sitios específicos, dan lugar a la formación de un complejo de iniciación entre las 21pb y la caja TATA, que incluye a la RNA pol II y otros factores. Dicho complejo estaría en posición para iniciar la síntesis de RNA y la caja

TATA y facilitaría el paso a través de la abertura de la doble hélice.

Por último Seholer y Gruss (1984), demostraron el requerimiento de moléculas celulares para el funcionamiento de templados que contengan secuencias estimuladoras. Dichas moléculas interactúan con alta afinidad, en forma célula-específica y/o tejido-específico.

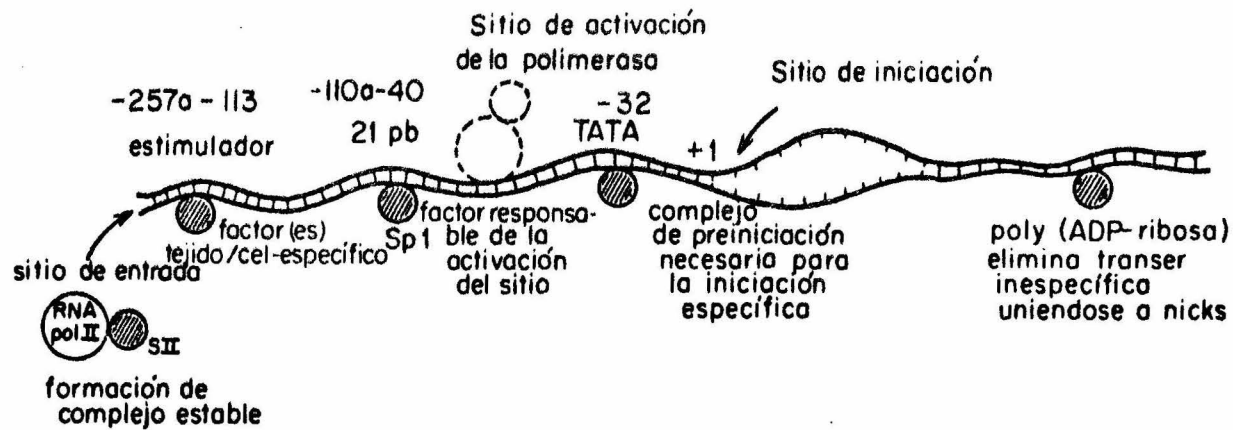
3.- RNA polimerasa II.

La RNA polimerasa II, es la enzima responsable de la transcripción del RNA heterogéneo nuclear, el cual a través de procesamiento da lugar al RNA mensajero. Se localiza en el nucleoplasma y es sensible a bajas concentraciones de amanitina (Roeder, 1976). La enzima pesa alrededor de 500,000 daltones y consta de aproximadamente 10 subunidades de carácter ácido. En la célula se pueden localizar tres especies de la holoenzima, estas son: IIO, IIA y IIB, las cuales difieren tanto en el peso molecular de su subunidad mayor (IIO-240kd, IIA-214kd y IIB-180kd), como en el grado de fosforilación de esta misma subunidad (IIO>IIA>IIB).

Aparentemente en la levadura un sólo gen codifica para las tres subunidades (Ingles y cols. 1984). Tanto la RNA polimerasa IIO como la IIA son especies que se presentan en forma natural en la célula (Woo-Yeon y Dahmus subm), siendo

la IIo la que se ha encontrado unida a cromatina (Garcia-carranca 1984). La RNA polimeras IIb no se detecta en extractos celulares completos y parece provenir de una proteólisis limitada de la región C terminal de las subunidades IIo y/o IIa. (Woo-Yeon y Dahmus enviado para su publicación). La región C terminal de las subunidades IIo y IIa, está constituida por 52 repeticiones de siete aminoácidos Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser. Anticuerpos monoclonales dirigidos contra esta zona, inhiben la transcripción específica pero no así a la inespecífica (Dahmus y Kedinger 1983), por lo que esta región debe de jugar un papel importante en la fidelidad de la transcripción.

FIGURA 3. SITIOS EN EL DNA Y FACTORES CELULARES INVOLUCRADOS EN LA TRANSCRIPCIÓN DEPENDIENTE DE RNA POLIMERASA II. Las siguientes, son las regiones en el DNA que se ha sugerido son importantes en la transcripción dependiente de la RNA polimerasa II: La caja TATA a -32pb es responsable de situar a la RNA polimerasa II en el sitio +1, interactúa con un factor dando lugar a un complejo de preiniciación necesario pero no suficiente para la transcripción; Las repeticiones de 21pb (de -40 a -110) y el factor Sp1 importantes en la activación de la RNA polimerasa II. en SV-40 y la caja CAAT, su homólogo en otros sistemas; Las secuencias estimuladoras de la transcripción (de -113 a -257), interactuando con factores tejido/célula específicos; el factor poly (ADP-ribosa), el cual elimina transcripción inespecífica y por último el factor SII que forma complejo con la RNA polimerasa II.



4.- Transcripción "in vitro" dependiente de RNA polimerasa II.

Para lograr la transcripción en un sistema libre de células que mantenga la iniciación específica se requieren de cuatro elementos: un templado que contenga un promotor fuerte, la RNA polimerasa II, un extracto celular que contenga los factores celulares necesarios y los cuatro ribonucleótidos; todo esto en presencia de una concentración de sales óptima.

Hasta ahora se han reportado tres sistemas de transcripción "in vitro" dependientes de la RNA polimerasa II. El primero fue reportado por Weil y cols. (1979 b). En el se utilizó un extracto citoplasmático proveniente de células KB humanas denominado S-100 (difiere con un extracto citoplasmático normal en que después de la obtención del extracto, éste, se centrifuga a 100,000xg durante una hora, eliminando organelos y estructuras grandes); como templado un fragmento del promotor tardío de Adenovirus-2 clonado en el plásmido PBR-322, (cortado en diferentes sitios preestablecidos) y por último, a la RNA polimerasa II exógena. Al realizar los ensayos se encontraron transcritos "truncados" del tamaño esperado y con la estructura de cubierta ("cap"); con lo que se demostró que el sistema es capaz de iniciar la transcripción específica.

El segundo (Manley y cols. 1980) utilizando un extracto

completo y relativamente crudo, proveniente de células HeLa de carcinoma de cérvix uterino, junto con un templado igual al utilizado en el sistema descrito por Weil (1979 b), con la diferencia que el extracto no requiere de la adición de RNA polimerasa II exógena. Parece ser que la eficiencia de este sistema es mayor que el reportado por Weil.

Por ultimo el sistema desarrollado por Dignam y cols (1983 a,b) en el que se utiliza un extracto proveniente de núcleos aislado de células HeLa, el cual se trata con una concentración de NaCl 0.42M, el extracto puede ser utilizado también para la transcripción catalizada por la RNA polimera III.

Los sistemas de transcripción "in vitro" han servido para dilucidar muchos de los eventos que tienen lugar en la iniciación de la transcripción, algunos ejemplos de esto son: 1. requerimiento de hidrólisis del enlace del ATP para iniciar la transcripción (Samuels y cols. 1984). 2. La caracterización del sitio "cap" como el sitio de iniciación de la transcripción (Weinmann y cols. 1983), etc.

Dada la complejidad de los procesos moleculares en los sistemas eucariotes, ha sido necesario, para lograr recopilar información sobre los mismos, utilizar sistemas modelos; los cuales presentan ventajas, como serían, manifestar características del genoma de células eucariotes y a la vez mostrar simplicidad en su manipulación.

Entre estos sistemas modelos encontramos a los de

transcripción "in vitro" descritos anteriormente. El lograr reproducir en éstos, procesos y eventos que afecten a la célula íntegra, es de gran importancia para el entendimiento de los mismos

OBJETIVO

OBJETIVO GENERAL.

Determinar, si es posible caracterizar la actividad supresora de la transcripción (presente en fracciones citoplasmáticas de células infectadas) en un sistema de transcripción "in vitro".

OBJETIVOS PARTICULARES.

Para poder cumplir con el objetivo general, nos hemos planteado los siguientes objetivos particulares:

- a.-Desarrollar un sistema de transcripción "in vitro", que sea dependiente de RNA polimerasa II y capaz de iniciar a partir de un promotor eucariote fuerte.
- b.-Establecer el efecto que tienen los extractos citoplasmáticos provenientes de células infectadas sobre la transcripción específica.

ESTRATEGIA

Para cumplir con nuestros objetivos, nos hemos planteado las siguientes estrategias:

1. Desarrollar un sistema de transcripción "in vitro":

1.1 Como fuente de factores transcripcionales y RNA polimerasa II, se obtuvo un extracto celular total, como el reportado por Manley y cols. en 1980, a partir de células HeLa.

1.2 Se propagó y extrajo de bacterias E.coli, al plásmido pLax, el cual contiene el promotor tardío de Adenovirus-2 que fungió como promotor eucariote fuerte en el sistema.

2. Determinar el efecto de extractos citoplasmáticos provenientes de células infectadas, sobre la transcripción específica de nuestro sistema.

2.1 Tras la infección con el virus de la poliomielitis a células HeLa, se realizó una extracción citoplasmática.

2.2 Se ensayó el efecto de diferentes concentraciones del extracto citoplasmático infectado sobre el sistema de transcripción "in vitro", y se determinó, si alguna de ellas inhibe la transcripción específica.

2.3 Se preincubó, a diferentes tiempos, el extracto citoplasmático infectado con el templado de DNA (Bossarty cols. 1984), y se estudió, el posible efecto sobre la transcripción específica de nuestro sistema.

MATERIALES.

1. Material Biológico.

La línea celular HeLa, proveniente de cáncer de cérvix uterino. Se obtuvieron a partir de la American Type Culture Collection (ATCC). Se propagaron en el laboratorio del Dr. Carlos Fernández-Tómas a una densidad de $3-6 \times 10^6$ cels/ml.

b. Se trabajó con el tipo 1 (Mahoney) del virus de la poliomielitis, en el pasaje 25 de su propagación en el laboratorio del Dr. Carlos Fernández-Tómas. Se obtuvo del laboratorio del Dr. David Baltimore del Instituto Tecnológico de Massachusetts (MIT).

c. Como templado se utilizó el promotor tardío de Adenovirus-2, clonado en el plásmido PBR-322, dando como resultado el plásmido Plax (Amp-R). Se obtuvo del Dr. R. Tjian de la Universidad de Berkley, CA, E.U.A., quien lo obsequió al Dr. P. Gariglio. La cepa de bacteria E.coli HB101 (Amp-R, Tet-R), en la que el plásmido es propagado fue un obsequio del Dr. G. Guarneros.

2.Reactivos.

a.El cloroformo, bicarbonato de sodio, fosfato de sodio monobásico dihidratado, acetona, alcohol isoamílico, cloruro de calcio, hidróxido de sodio, cloruro de sodio, glucosa, cloruro de magnesio heptahidratado, glicerol, cloruro de potasio, fosfato de sodio dibásico, fosfato de potasio monobásico, carbonato de sodio, tartrato de sodio potasio y sulfato de cobre pentahidratado fueron obtenidos de J.T.Baker(México).

b.El tritón X-100, ditiotreitól, HEPES, adenosina 5' trifosfato, uridina 5' trifosfato, guanosina 5' trifosfato, citidina 5' trifosfato, cloramfenicol, mercaptoetanol, tris-base, albúmina de suero bovino, aminoácidos no esenciales, amanitina, lisozima, reactivo de folin, TEMED, RNasa A y ampicilina fueron obtenidos de Sigma Chemicals, Co. (EUA).

c.El azul de bromofenol, xileno de cyanol, bromuro de etidio, fenol ultrapuro, formamida, y persulfato de amonio fueron obtenidos de BRL (EUA).

d.La amberlita MB3, acrilamida, NN'-metilenbiacrilamida y agarosa fueron obtenidas de BDH (EUA).

e. La bactitripton, extracto de levadura, agar y casa-aminoácidos fueron obtenidos de DIFCO (EUA).

f. El etanol absoluto, tolueno, acetato de sodio, sulfato de amonio y ácido acético fueron obtenidos de Merck (MeNMxico).

g. La urea y sacarosa recristalizadas fueron obtenidas de Shwartz-Mann (EUA).

h. La penicilina G. potásica y el sulfato de estreptomycin fueron obtenidos de Farmacéuticos Lakeside (México).

i. El medio mínimo esencial (MEM) fue obtenido de Gibco-Laboratories, Inc (EUA).

j. Las bolsas de diálisis fueron obtenidas de Spectrum Medical Industries, Inc (EUA).

Composición y preparación de las soluciones.

En la preparación de todas las soluciones se empleó agua bidestilada. Se esterilizó por autoclave (EA) a 15lb/cm² de presión a 120C durante 20 min. o por filtración (EF) a través de membranas Millipore HWP (0.22 μ m), según se indique. Se guardó a temperatura ambiente, a 4C o se congeló a -20C como se señale en cada solución.

Preparación de los templados.

Medio L. 10gr. de bactotripton, 10gr de NaCl, 5gr de extracto de levadura y 1 ml de NaOH 2M. Aforar a 1 lt. EA ,guardar a 4C.

Cajas agarosa-bromuro de etidio. Disolver agarosa en agua a una concentración de 1%. Añadir 0.5 μ g/ml de EtBr, agitar y vaciar de 20 a 25ml en una caja petri.

Solución 1. 0.05 M de glucosa, 0.01M de EDTA ph 8.0 y 0.025M de Tris-HCl pH 8.0 EA y guardar a 4C.

Solución 2. Preparar fresca. 0.2N de NaOH y SDS al 1% EF .

Solución 3. 3M de acetato de sodio pH 5.0, 24.48gr de

NaC[2]H[3]O[2] 3H[2]O + HOAc glacial. Aforar a 100ml. el pH debe quedar justa. EA guardar a temperatura ambiente.

Amortiguador TE. 0,01M de Tris-HCl pH 7.4 y 0.001M de EDTA. EA guardar a 4C.

Amortiguador de restricción Taq1 (10X). 0.1M de Tris-HCl pH 8.4, 0.06M de MgCl[2], 1M de NaCl y 0.06M de MET. EA se guarda a 4C.

Amortiguador TB (10X). 0.083M de Tris-base, 0.083M de ácido bórico y 0.0025M de EDTA. Checar que el pH sea de 8.3. EA guardar a temp. amb.

Colorante B.J. (10X). 0.1M de Tris pH 8.5 (0.28M de Tris-HCl y 0.72M de Tris-base), 0.05M de EDTA pH 8.0, glicerol al 50%, azul de bromofenol al 0.25% y xileno de cianol al 0.25%.

Buffer de Columna. .5M de NaCl, 50mM Tris-HCl, 10mM de EDTA.

Obtención de los extractos.

Medio de Infección. Es el medio mínimo esencial (MEM 1X) sin glutamina, metionina, penicilina, estreptomina y suero EF se guarda a -20C.

Líquido de centelleo tolueno-tritón. 1lt de tolueno, 600ml de triton X-100, 168ml de agua bidestilada y 3.3gr de PFO.

Amortiguador 1. Para 1lt. pesar 8.4gr de NaCl, 0.2gr de KCl, 1.15gr de Na₂HPO₄ y 0.2gr de KH₂PO₄. Después de EA llevar a 0.01M de MgCl₂. el pH debe ser de 7.0 se guarda a 4C.

Amortiguador 2. 0.01M de Tris-HCl, 0.001M de EDTA, 0.005M de DTT. Ajustar el pH a 7.9 EA guardar a 4C.

Amortiguador 3. 0.05M de Tris-HCl, 0.01M de MgCl₂, 0.002M de DDT, 25% de sacarosa(w/v) y 50% de glicerol(v/v). Ajustar el pH a 7.9 EA guardar a 4C.

Amortiguador 4. 0.02M de HEPES, 0.1M de NaCl, 0.125M de MgCl₂, 0.0001M de EDTA, 0.002M de DTT y 17% de glicerol (v/v). Ajustar el pH a 7.9 EA guardar a 4C.

Solución saturada de sulfato de amonio. 69.7gr de

(NH₄)₂SO₄ en 100ml de agua bidestilada EA se guarda a temp amb.

Amortiguador PBS. Es igual al amortiguador 1, pero sin MgCl₂. EA se guarda a 4C.

Amortiguador hipotónico. 0.01M de HEPES, 0.01M de KCl, 0.0015M de MgCl₂ y 0.003M de DTT. Ajustar el pH a 7.9. EA y guardar a 4C.

Amortiguador hipertónica. 0.3M de HEPES, 1.4M de KCl, 0.03M de MgCl₂. Ajustar el pH a 7.9. EA se guarda a 4C.

Amortiguador R'. 0.05M de Tris-HCl, 0.1M de NaCl y 0.0002M de DTT. Ajustar el pH a 7.9. EA se guarda a 4C.

Solución C . (Determinación de proteína). 50 partes de la solución A con una parte de la solución B. Se prepara fresca.

Solución A. 0.094M de Na₂CO₃, 0.05M de NaOH y 0.047M de tartrato de sodio y potasio. Se guarda a 4C.

Solución B. 0.002M de CuSO₄·5H₂O. se guarda a 4C.

Ensayos de Transcripción.

Mezcla de nucleótidos para transcripción. 0.0025M de ATP, GTP y UTP.EF se guarda a -20C.

Solución de CTP no marcada.0.00075M de CTP. EF. se guarda a -20C.

Solución SR. 0.05M de NaOAc pH 5.0 y 0.5% de SDS. Preparar fresca.

Colorante-formamida. Agitar 100ml de formamida con 5gr de resina desionizadora Aberlita MB3 (o MB1) durante 30min. Remover la resina por filtración. Anadir 0.08gr de xileno de cianol, 0.08gr de azul de bromofenol y 0.02M de EDTA. Se guarda a temp amb.

Bolsas de diálisis. Hervir las bolsas con Na₂CO₃ al 10% (w/v) y con 10mM de EDTA, durante 15 min. Lavarlas de 3 a 5 veces con agua bidestilada estéril. Repetir estos dos pasos hasta que la solución quede amarilla. Añadir 1mM de EDTA. EA. Se guarda a 4C, con 2 gotas de cloroformo

Amortiguador de transcripción de nucleos. 2mM de MnCl₂, 80mM (NH₄)₂SO₄, 1mM DTT, 20mM Tris-HCl.

Amortiguador de lavado de papeles de transcripción de núcleos. 195gr. Na_2HPO_4 , 40gr. $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 5gr. SDS. Se afora a 5lt. con agua bidestilada. Se almacena a temperatura ambiente.

MÉTODOS.

1. PREPARACION DEL TEMPLADO.

1.a. Aislamiento del plásmido.

Tomar 100ul de una colonia de bacterias con plásmido y crecerla a 37C en 400ml de medio L con Amp (50ug/ml), durante toda la noche. Centrifugar a 6000rpm. en la centrifuga Sorvall RC-5B (excepto por las asi indicadas, todas las centrifugaciones se hicieron en esta centrifuga) por 20 min. Lavar la pastilla con 35ml de solución 1. Volver a centrifugar a 6000rpm. por 20 min. Resuspender la pastilla en 10ml de solución 1, dejar reposar por 5 min. a temperatura ambiente. Anadir 20ml de solución 2 fresca, y mezclar varias veces, dejar reposando 5min. en hielo. Anadir 15ml. de NaOAc 3M frio e invertir varias veces, dejar reposando 30 min en hielo. En la ultracentrifuga utilizando el rotor 60ti centrifugar a 20000 rpm por 10 min. a 4C. Pasar el sobrenadante a un tubo nuevo. Precipitar con 2 volúmenes de EtOH a temperatura ambiente por 15 min. Centrifugar por 15 min. a temperatura ambiente a 10000 rpm. y resuspender en 5ml de buffer de columna. Extraer con fenol-cloroformo y centrifugar por 5 min a 10000rpm. Extraer con cloroformo y centrifugar por 5 min a 10000 rpm. Calentar a 68C por 10 min

para evaporar el cloroformo restante. Anadir RNasa 25ug/ml en AcONa 50 mM y dejar reposando a temperatura ambiente 1 hora. Extraer con fenol-cloroformo y centrifugar por 5 min. a 10000 rpm. Extraer con cloroformo y centrifugar a 10000 rpm por 5min. Precipitar con 2 volúmenes de EtOH a temperatura ambiente por 15 min. Centrifugar por 20 min a 10000 rpm, escurrir bien la pastilla y resuspender en 1ml de buffer de columna. Colocar el mililitro de muestra en una columna de Sephadex 4B de 18X1 cm, permitir que se adsorba y colocar un mililitro mas de buffer de columna, permitir que se adsorba y conectar la columna a un flujo fijo de buffer de columna, al mismo tiempo empezar a recolectar las muestras(alrededor de 500ul por tubo), el plásmido saldrá en los primeros 12 tubos. Precipitar las muestras con 2 volúmenes de EtOH por 30 min a temperatura ambiente y centrifugar por 15 min a 10000rpm., escurrir muy bien la pastilla y resuspende en un volumen pequeño de TE.

1.b.Determinación de la concentración de DNA.

Colocar diferentes diluciones de la muestra problema y de una muestra de concentración de DNA conocida en una caja de agarosa BrEt. Permitir que se adsorban y observar la caja a través de un transiluminador de luz ultravioleta.modelo TM-36. Por comparación en la fosforescencia determinar la

concentración de DNA.

1.c. Restricción del DNA.

Añadir 18ul (menos el volumen del DNA) de agua bidestilada estéril a un tubo de polipropileno de 1.5ml. Añadir 2ul de amortiguador de restricción 10x. Añadir la cantidad deseada de DNA. Agregar, por último, la enzima de restricción Taq I (cuando se utilice otra enzima se darán las especificaciones en el pie de figura) a una concentración de 6 unidades por ug de DNA. Dejar incubando durante 1hr. a 65C. Colocar inmediatamente en hielo.

1.d. Análisis de los fragmentos de DNA en minigel de agarosa al 1%.

Disolver 0.2gr. de agarosa en 20ml. de amortiguador TB 1X a 70-80C. Llenar la cámara y poner el peine. Dejar gelificar por 30 minutos. Retirar el peine y llenar la cámara con amortiguador TB 0.5X. Añadir a las muestras (de 20ul aprox) 2ul de colorante B.J. (10X) y ponerlas en los pozos del gel. Correr a 90V hasta que el xileno de cianol se encuentre a 2-3cm. del polo positivo. Tintar el gel con bromuro de etidio (5ug/ml.) durante 5 min. Las bandas se visualizaron en un

transiluminador de luz U.V. modelo TM-36.

2. OBTENCION DE LOS EXTRACTOS.

2.a. Cultivo de células HeLa.

Crece las células HeLa S3 en suspensión, a 37°C, en medio mínimo esencial (MEM), suplementado con 10% de suero fetal de ternera, 1% de aminoácidos no esenciales y 2% de penicilina/estreptomicina. Mantener el crecimiento entre $3-6 \times 10^6$ células/ml. El tiempo de duplicación es aproximadamente de 24hrs.

2.b. Infección de las células HeLa con polio.

Cosechar un cultivo de células HeLa en suspensión a 2,500 rpm a temperatura ambiente durante 3 min. en una centrifuga Internacional PR-6000. Lavar las células con 5 volúmenes de medio de infección. Resuspender las células a una densidad de 1×10^7 células/ml. en medio de infección. Dejar en agitación a temperatura ambiente por 10min. para permitir la completa resuspensión de las células. Dividir el cultivo en dos lotes. Someter uno de ellos a infección fingida (control). El otro lote, infectarlo con polio a una multiplicidad de infección de 100. Incubarlos a 25°C durante 30 min. para permitir la adsorción del virus. Añadir un volumen del medio de infección (DS) y incubarlo por otros 15 minutos para impedir nueva

readсорción. Centrifugar, a 2500 rpm en la misma centrifuga, para eliminar los virus no adsorbidos. Resuspender las células a una densidad de 5×10^6 cels/ml en medio de infección suplementado con 2% de suero fetal de ternera dializado y 1% de L-glutamina, e incubar a 37C; a partir de este momento se considera iniciada la infección. Dejar a 37C en agitación por 3 horas.

2.c. Seguimiento de la infección.

Para monitorear el proceso de infección, poner, desde el principio de la misma, 1ml del cultivo control y uno del infectado en dos tubos por separado en agitación a 37C. Colocar por separado en 12 tubitos 2uCi/ml de $[^{35}S]$ Metionina diluida en medio de infección. A los 60, 120 y 180 minutos de infección tomar de los tubos de muestra 50ul y colocarlos en los tubitos que contienen la metionina marcada (esto se hace por duplicado). Mantener en agitación a 37C durante 5 minutos. Aregar 5ul de metionina 100X y agitar a 37C 3 minutos mas. Colocar toda la muestra en papel Whatman 3mm. Anadir inmediatamente 50ul de TCA al 5% y dejar secar. A 4C lavar los papeles en TCA al 10% por 10min, con TCA al 5% por otros 10min y en EtOH al 30% por 20min. Secar los papeles y contar con liquido de centelleo tolueno-tritón en un contador de centelleo liquido (Packard 3385).

2.d. Extracto de Manley (Manley y cols 1980).

A partir de un cultivo de células HeLa (control e infectado), lavar las células con 5 vol de la pastilla del amortiguador 1, bajar la pastilla en la centrifuga International PR6000 a 2500rpm durante 10 minutos a 4C (trabajar a esta temperatura en el resto de los pasos). Resuspender la pastilla en 4 volúmenes de la pastilla en amortiguador 2. Dejar en agitación suave durante 20 min. Homogenizar en un Dounce metálico con 8 a 10 golpes del émbolo B. Verificar la ruptura de las células al microscopio. Añadir 4 volúmenes de pastilla de amortiguador 3 y agitar suavemente durante 20 min. Agregar 1 volumen de pastilla de solución saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pH7.0 gota a gota en agitación continua. Dejar agitando durante 20 min. Centrifugar a 50000 rpm con el rotor 60Ti en la ultracentrifuga Beckman LB-55 durante 3 hrs. Precipitar el sobrenadante I con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ solido (0.33 g/ml de suspensión). Disolver lentamente. Añadir 0.01 ml de NaOH por cada 10g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ solido añadido en el paso anterior. Agitar durante 30 min. Centrifugar a 11300 rpm en el rotor SS34 de la centrifuga Sorvall RC-5B durante 20 min. Resuspender el precipitado con 1/10 del volúmen del sobrenadante I en el amortiguador 4. Dializar esta suspensión contra 100 volúmenes del mismo amortiguador durante 8 hrs.,

haciendo un cambio a las 4hrs. Centrifugar el dializado a 9300 rpm durante 10 min. Dividir el sobrenadante II en alícuotas de 50-100ul y congelar rápidamente en nitrógeno líquido.

2.e. Extracto citoplasmático y núcleos.

Tomar un cultivo de células HeLa (control e infectado) y cosecharlas a 2500 rpm en la centrifuga PR6000 a 4C (trabajar a esta temperatura en el resto de los pasos). Lavar con 2 volúmenes de pastilla con amortiguador PBS. Lavar con 2 volúmenes de pastilla, con buffer hipotónico. Resuspender en 2 volúmenes de pastilla con buffer hipotónico. Dejar 10 min. en hielo en agitación. Homogenizar en un Dounce metálico con 7 golpes. Añadir 0.1vol de pastilla de amortiguador hipertónico. Dar 3 golpes mas en el Dounce. Colocar la suspensión en un colchón de glicerol al 30% en amortiguador R' (6ml de colchón/ ml de muestra). Centrifugar a 3200 en la centrifuga PR6000 durante 10 min. Tomar con cuidado la fase superior, (correspondiente al citoplasma) sin tocar el colchón de glicerol. Dializar contra 100 volúmenes de amortiguador 4 durante 8 horas, haciendo un cambio a las 4 hrs. Repartir el dializado en alícuotas de 50-100ul y congelar rápidamente en nitrógeno líquido. Por otro lado la pastilla nuclear es resuspendida en amortiguador de transcripción nuclear y 10%

de glicerol y congelada en nitrógeno líquido.

2.f. Determinación de la concentración de proteína (Lowry 1951).

Añadir 1 ml. de solución de C a 0.2ml de muestra (por duplicado) y agitar bien. Dejar 10 min. y añadir 0.1ml de reactivo de folin (folin diluido 1:1 con agua). Mezclar bien, inmediatamente. Dejar al menos 45 minutos para que se desarrolle el color. Leer a 660 en el espectrofotómetro Zeiss PMQII. Usar agua como blanco y una solución de albúmina de suero bovino para hacer la curva patrón.

3. ENSAYO DE LA INICIACION ESPECIFICA DE LA TRANSCRIPCION IN VITRO.

3.a. Incubación "in vitro" y extracción del RNA.

La mezcla de reacción contiene 500 uM de ATP, GTP, y UTP; 50uM de CTP; 5uCi de [³²JP CTP; 0.6 ug de pLax cortado con TaqI; y extractos segun se indique en cada experimento. La concentración final de sales es de 12mM HEPES pH 7.9, 60mM de KCl, 7mM de MgCl₂, .2mM de EDTA, 1.3mM de DTT y 10% de glicerol. Aforar con agua bidestilada estéril a 25ul. Incubar a 30C durante 60 min. Parar la reacción con 225ul de la solución fresca S.R. Extraer una vez con fenol equilibrado con agua. Extraer 2 veces con cloroformo/alcohol isoamilico (24:1). Llevar a una concentración final de 0.15M con una solución de NaOAc pH 5.0. Precipitar con 3 volúmenes de etanol al 100% (a -20C) y dejar 15 min a -70C. Centifugar las muestras a 15000rpm en una centrifuga Eppendorf durante 15 min. a 4C. Secar la pastilla en un secador de muestras con vacío Savant SV100H durante 30 min. aprox. Resuspender en 5ul de agua bidestilada estéril y añadir 20 ul de colorante formamida. Calentar las muestras a 65C durante 5 min y enfriar rápidamente en hielo.

3.b. Preincubaciones en los ensayos de transcripción "in vitro".

La mezcla de preincubación contiene 0.6ug de pLax /Taq1; agua bidestilada estéril (el volumen necesario para que al tiempo cero de reacción se alcancen los 25ul) y cantidades diferentes de extractos citoplasmáticos (se menciona en cada experimento). Realizar las preincubaciones a 30C durante diferentes longitudes de tiempo (se menciona en cada experimento). Tras este tiempo agregar la mezcla de reacción y el extracto de Manley el resto de los pasos son idénticos a lo mencionado en el inciso 3a.

3.c. Análisis de los transcritos en gel de poliacrilamida 4%/7M urea.

Preparar un gel de poliacrilamida 4%/7M urea, de acuerdo a las siguientes proporciones: 5ml de una solución de acrilamida/bisacrilamida al 40%(38:2), 21.08 g de urea recristalizada, 5ml de amortiguador TB(10X), agua a menos de 50 ml. Calentar y agitar. Aforar a 50ml. Degasificar durante 15min. Añadir 50ul de TEMED y 200ul de P.S.A. al 10%(w/v). Dejar polimerizando al menos una hora. Precorrer el gel 1 hr. a 250V en una fuente de poder ISCO. Llenar los pozos del gel con las muestras. Correr el gel en las mismas condiciones

hasta que el xileno de cianol esté a 1cm del polo positivo (2.5 hrs aprox). Sacar con cuidado el gel y envolverlo en una película transparente de plástico. Meterlo en un cassette para autorradiografía Kodak X-O Matic junto con una placa de fotografía Kodak X-Omat K. Exponerla durante 2 días aproximadamente a -70C.

3.d. Análisis densitométrico de los autorradiogramas.

Analizar densitométricamente los densitogramas en espectrofotómetro Beckman DU-7 una longitud de onda de 560nm.

4. ENSAYO DE TRANSCRIPCIÓN EN NÚCLEOS AISLADOS DE CELULAS HeLa S3.

4.a. Ensayo de transcripción.

La mezcla de reacción contiene .001M de ATP, GTP, CTP; 76µm de UTP; 10µCi de $[3\text{H}]\text{UTP}$; 5×10^6 núcleos control; y una concentración final de sales de .002M de MnCl_2 ; .001M de DTT; .02M de Tris-HCl, pH 7.9; .08M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; Llevar a un volumen final de 125µl. El tiempo de reacción, los tiempos de preincubación y la cantidad de extractos adicionados se señala en cada experimento. Parar la reacción con 10µl de EDTA 0.2M y colocar en frío. Medir la incorporación de $[3\text{H}]\text{UMP}$ a RNA colocando la mezcla de reacción en papeles DE/81.

4.b. Lavado de papeles DE/81.

Lavar los papeles con amortiguador Buffer de Lavado, durante 10 min por 7 veces. Lavar una vez por 10 min. con agua bidestilada, lavar rápidamente con etanol absoluto, dejar secar y contar con líquido para centelleo tolueno-triton.

RESULTADOS

1.- INFECCION DE CELULAS HeLa CON POLIOVIRUS: "PILOTO DE INFECCION".

Como se mencionó en la Introducción, experimentos anteriores han demostrado que la infección de células HeLa con picornavirus da lugar a un abatimiento tanto en la síntesis de RNA, como en la traducción del mismo (Baltimore, 1962). Con el fin de seguir el desarrollo de estos eventos, se realizó una infección de células HeLa con virus de la polio midiéndose la síntesis de proteínas mediante la incorporación de [35S] metionina a material ácido-insoluble en un experimento de pulsos (Ver Materiales y Métodos).

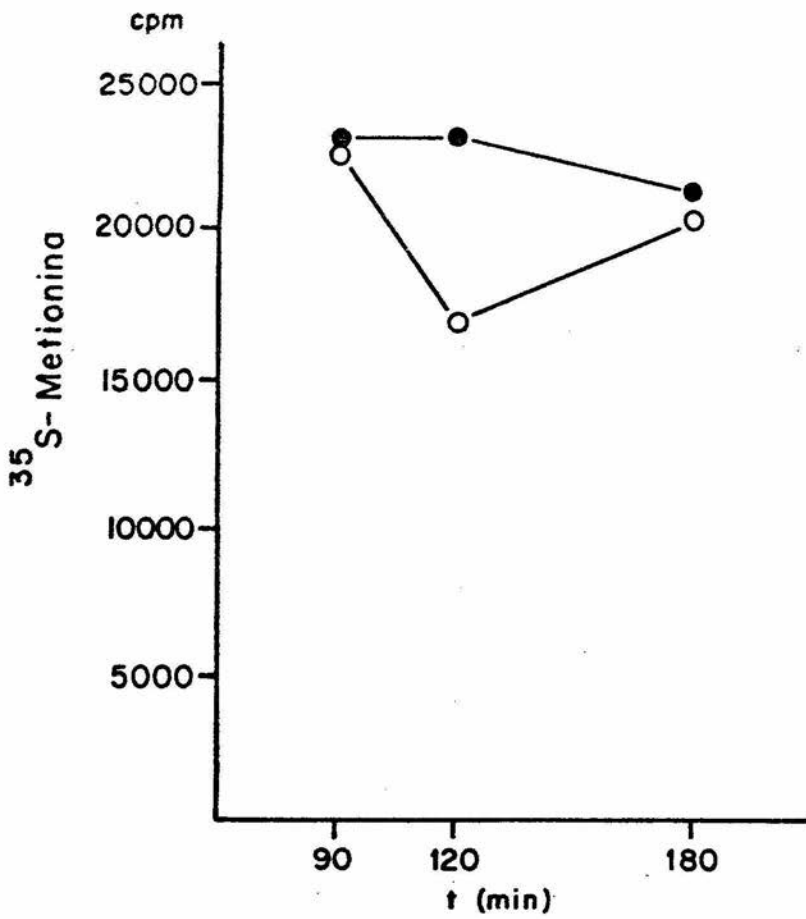
La figura 4 muestra que, en tanto la incorporación de [35S] metionina en el cultivo de células bajo infección fingida (control) se mantuvo relativamente constante, en el cultivo infectado, se detectó, entre los 90 y 120 minutos un decremento en la incorporación de [35S] metionina, reflejando, la inhibición de la traducción celular. A partir de este momento se inicio la síntesis de proteína viral (Holland, 1963), observándose en la gráfica como un incremento en la incorporación de [35S] metionina. Este experimento muestra que la infección se llevo a cabo.

FIGURA 4. PILOTO DE INFECCION CON POLIO

Cultivos de 5×10^5 cels/ml. infectadas y control, fueron marcados a los 90, 120 y 180 minutos mediante un pulso de 3 minutos con $[^35S]$ metionina como se describió en Materiales y Métodos.

Células Control:

Células Infectadas:



2. OBTENCION DEL EXTRACTO CELULAR TOTAL (ECT).

"In Vitro", la transcripción específica eucariote requiere, además de un templado que contenga un promotor fuerte y de la RNA polimerasa II, a una serie de factores que se encuentran en extractos de origen celular como es el extracto celular total (ECT), descrito por Manley y cols.(1980).

Se escogió utilizar el (ECT) de entre otra serie de extractos que contienen factores de iniciación, ya que, es el más eficiente para transcribir templados exógenos y es de fácil manipulación por no tenerle que suplementar RNA polimerasa II.

Se realizó cuantificación de proteína por el método de Lowry encontrándose 5.7 y 5.5 ugr de proteína/célula en los ECT control e infectado respectivamente.

3.- OBTENCION DEL TEMPLADO.

Se utilizó como templado del sistema un segmento de DNA que contiene el promotor tardío del virus adeno 2. El cual, por utilizar la maquinaria de transcripción del huésped (Nevins y Chen-Kiang, 1981) y por contener las las señales de iniciación (Weinmann y cols. 1983), se le considera un promotor eucarióte fuerte.

Dicho segmento se encuentra clonado entre los sitios Sall y Bam HI del plásmido pBR322, dando lugar a pLax (ver figura 5). Con la metodología utilizada para la propagación y purificación del DNA recombinante, se obtuvieron 420 ug de DNA, a una concentración de 1.4 ug de DNA en 2 ul de amortiguador TE(ver Materiales y Métodos).

Dynan y Tjian (1983a) reportaron que en un ensayo de transcripción "in vitro", al emplear como templado el plásmido pLax cortado con la enzima de restricción Taq I, encuentran un transcrito predominante de 560 bases, que es el esperado, si la transcripción se lleva a cabo en el fragmento que contiene al promotor de Adenovirus e inicia específicamente en el sitio conocido como +1.

En el presente trabajo el templado utilizado fue, el mismo pLax, cortado con Taq I (Figura 6) en una relación de 1 ug de DNA/6 unidades de enzima. Obteniendo los 7 transcritos esperados; el fragmento de 830 pb es el que contiene al promotor tardío de Adenovirus.

FIGURA 5. MAPA DE PLAX. Al plásmido pBR322, se le clonó entre los sitios Sall-BamHI, un fragmento de 794 pb (línea gruesa en el esquema) que contiene el promotor tardío de Adenovirus-2, dando lugar a pLax. El esquema muestra los fragmentos generados al cortar el plásmido con la enzima de restricción TaqI (A, B, C, D, E, F y G).

Restricción con Taq I

- A- 830 pb
- B- 315 pb
- C- 368 pb
- D- 1444 pb
- E- 1307 pb
- F- 141 pb
- G- 475 pb

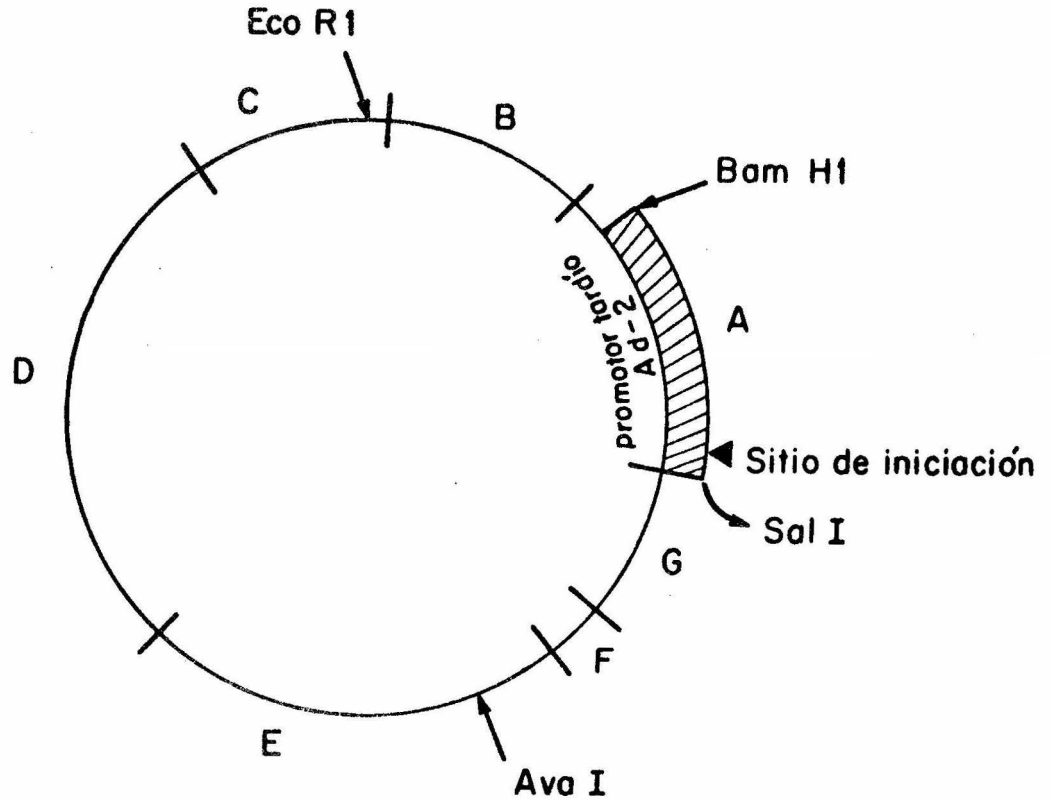
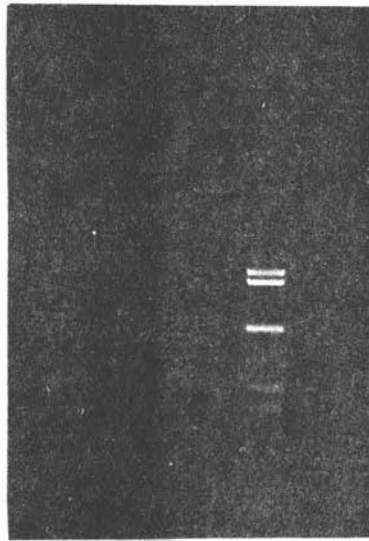


FIGURA 6. PATRON DE RESTRICCION DE PLAX.

Fotografía de un gel de agarosa 1.2% teñido con EtBr e iluminado con Luz UV, donde se muestra al pLAX y los fragmentos obtenidos al cortarlo con enzimas de restricción (Ver Métodos).

Carril 1: Marcador de peso molecular, DNA de Lambda digerido con Hind III 23,130pb, 9,419 pb, 6,557 pb, 4,371 pb, 2,322 pb, 2,028 pb, 564 pb y 125 pb. Carril 2, pLAX sin digerir 4,884 pb. Carril 3, pLAX digerido con EcoRI. Carril 4, pLAX digerido con TaqI 1,444 pb, 1,307 pb, 835 pb, 476 pb, 368 pb, 315 pb y 141 pb.

1 2 3 4

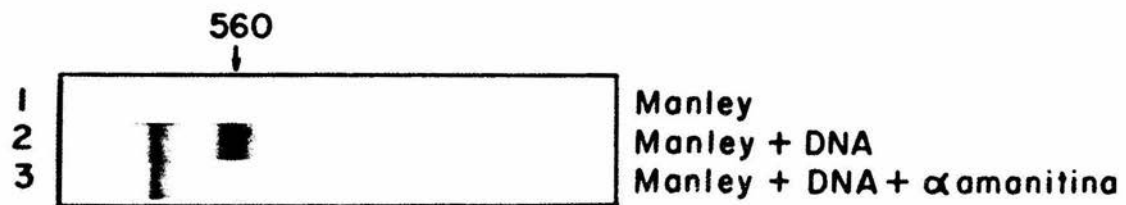


4.-INICIACION ESPECIFICA DE LA TRANSCRIPCION.

Habiendo obtenido los elementos requeridos para llevar a cabo la transcripción "in vitro", esto es, como templado al promotor tardío de Adeno-2 y como fuente de factores de transcripción al ECT descrito por Manley, procedimos a montar el sistema tal y como se menciona en Materiales y Métodos.

En la Figura 7 se muestra que la transcripción con el ECT es dependiente de DNA exógeno (carril 1), ya que en ausencia de éste no se encontró transcrito alguno. Al agregar a la reacción el plásmido pLax cortado con la enzima Taq I se encuentra el transcrito esperado de 560 bases (carril 2), esto indica la iniciación específica en nuestro sistema; iniciación específica dependiente de RNA polimerasa II; ya que el transcrito específico mostró alta sensibilidad a amanitina a una concentración de 1.0 ug/ul, concentración que inhibe la actividad de la enzima RNA polimerasa II(carril 3).

FIGURA 7. ENSAYO DE INICIACION ESPECIFICA DE LA TRANSCRIPCION DEPENDIENTE DE DNA EXOGENO Y DE RNA POLIMERASA II. La autorradiografia muestra la incorporación de $[^{32}P]$ CTP al transcrito específico durante la reacción "in vitro". El ensayo se llevó a cabo durante 60 minutos, tal y como se menciona en Materiales y Métodos. Carril 1: 85 ug de ECT. Carril 2: 85 ug de ECT suplementado con 0.6 ug de DNA. Carril 3: Igual que el carril 2, pero con amantina a una concentración de 1 ug/ml.



5.- EL ECT OBTENIDO DE CELULAS INFECTADAS TRANSCRIBE A BAJO NIVEL.

Crawford y cols.(1981) reportaron que en un sistema de transcripción "in vitro" dirigido por Adeno-2, el ECT obtenido de células infectadas (ECTi) transcribe específicamente con una muy baja eficiencia con respecto al extracto control. Estos datos fueron corroborados por el experimento descrito en la figura 8. Los mismos autores concluyen que dicho extracto es deficiente, en al menos un factor protéico requerido para la iniciación específica mediada por la RNA polimerasa II.

En la figura 8a se compara el transcrito de 560 bases obtenido tanto en presencia del ECT (carril 2) como el que se obtuvo en presencia del ECTi (carril 4). Con el fin de obtener datos cuantitativos, ambos autorradiogramas se analizaron por densitometría a 560 nm (figura 8b). Como se puede observar, aun cuando el ECTi transcribe específicamente, la eficiencia apenas alcanza el 50 % con respecto al transcrito obtenido con el ECT (comparar panel A y B).

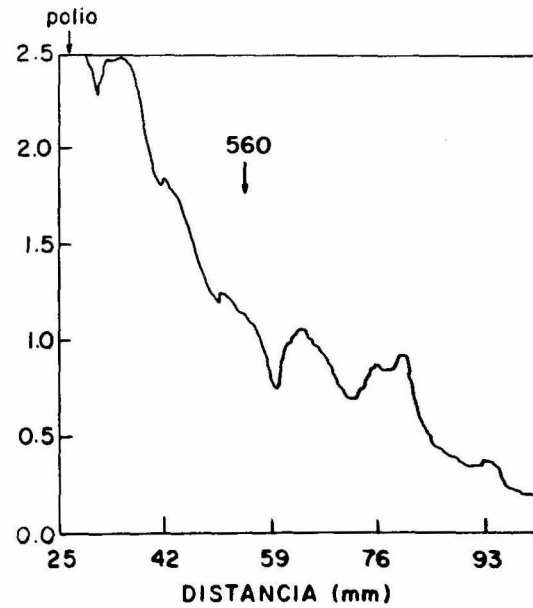
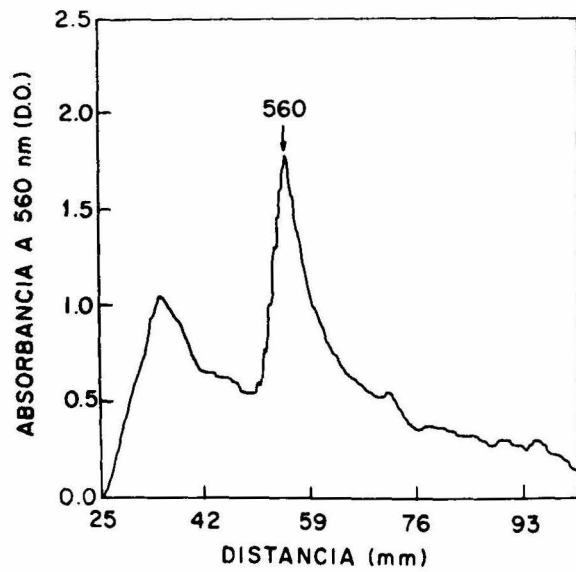
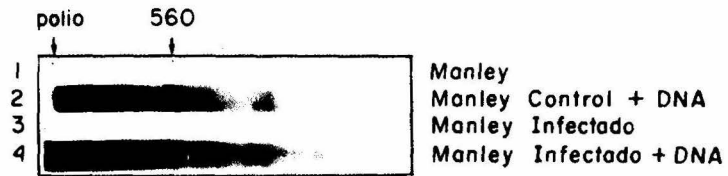
Los carriles 1 y 3 muestran la dependencia de ambos extractos por DNA exógeno.

FIGURA 8. TRANSCRIPCIÓN IN VITRO EN PRESENCIA DE ECTi. La autorradiografía muestra la incorporación de $[^{32}P]$ CTP en el transcrito de 560 bases durante 60 minutos en un ensayo de transcripción "in vitro", en presencia del ECTi tal y como se menciona en Materiales y Métodos.

a. Carril 1. ECT 60ug. Carril 2 ECT 60ug y Plax/Taq1 .6ug. Carril 3. ECTi 60ug. Carril 4. ECTi 60ug y Plax/Taq1 .6ug.

b. Panel A. Trazo densitométrico (560 nm) del autorradiograma que se muestra en el carril 2 (ECT).

Panel B. Trazo densitométrico (560 nm) del autorradiograma que se muestra en el carril 4 (ECTi).



6.-TRANSCRIPCIÓN "In Vitro" CATALIZADA POR EXTRACTOS CITOPLASMÁTICOS (EC).

Al realizar un ensayo de transcripción "in vitro", en presencia del ECT junto con el ECTi, Crawford (1981), encuentra que se producen los mismos niveles de transcripción específica que en los ensayos control. Por lo que, el ECTi además de carecer de algún factor, aparentemente tampoco contiene al inhibidor. Por otro lado, se ha reportado en la literatura (Baladin y Franklin, 1964 y Bossart y cols. 1982) que un extracto citoplasmático proveniente de células infectadas con picornavirus es capaz de inhibir la transcripción de núcleos aislados de células control. Con lo que en el presente trabajo decidimos determinar si era posible caracterizar en un sistema de transcripción "in vitro", dirigido por Adeno-2, la actividad inhibitoria presente en los extractos citoplasmáticos.

Iniciamos dicha caracterización, determinando la actividad transcripcional (tanto la endógena como la dependiente de DNA exógeno) presente en nuestros extractos. En la figura 9(a y b) se presenta el resultado de dicho ensayo. Como se puede observar, mientras que el extracto citoplasmático control (ECc) no es capaz de dirigir transcripción endógena (carril 1, 9a), en el extracto citoplasmático infectado (ECi) encontramos un transcrito endógeno de alto peso molecular que corresponde al producto

de transcripción del complejo de replicación (IR) del virus (carril 3, 9a). La actividad de alargamiento de la cadena de RNA viral, iniciada "in vivo", ha sido reportada en este tipo de extractos. (Crawford y cols. 1981).

Una vez caracterizada la actividad endógena de los extractos, se suplemento al sistema con los fragmentos de DNA provenientes de la restricción del plásmido Plax (uno de los cuales contiene al promotor tardío de Adeno-2, el cual funge como templado de nuestro sistema. Ver figura 5). El ECc produjo siete transcritos (carril 2 en 9a) sin que se observara síntesis preferencial de ninguno de ellos. En el caso del ECi (carril 4 en 9a) se observa tanto el transcrito de alto peso molecular ya mencionado del CR viral, como 7 transcritos; seis de ellos coinciden con los transcritos sintetizados por el ECc. Es de llamar la atención que el transcrito que no coincide, es precisamente el transcrito específico de 560b, correspondiente al fragmento del DNA que contiene al promotor de adenovirus-2 (Ver carril 2 en la figura 7) en su lugar se detecto un nuevo producto de alrededor de 500b.

Con el fin de cuantificar los diferentes transcritos obtenidos en ambos ensayos se llevó a cabo una densitometria de los autorradiogramas descritos en la figura 9a. El trazo densitométrico y el porcentaje del transcrito específico se muestra en la figura 9b y en la tabla 1, respectivamente. En lo que respecta al transcrito de 560 bases se encontró abatido

en la transcripción con ambos extractos citoplasmáticos (control e infectado) si se le compara con el ensayo en presencia del ECT (carril 1 en 9a). Este resultado era esperado dado que el ECT se encuentra "enriquecido" con proteínas que participan en la transcripción específica. Comparando los transcritos obtenidos en presencia de los EC encontramos por un lado que es menos específica que con el ECT, y por otro lado, que la transcripción dirigida por el promotor eucariótico de adenovirus es menos eficiente (o no se presenta) en presencia del extracto infectado.

FIGURA 9. TRANSCRIPCIÓN ENDOGENA Y EN PRESENCIA DE DNA EXÓGENO DE EXTRACTOS CITOPLASMÁTICOS (EC).

a. La autorradiografía muestra la incorporación de $[^{32}\text{P}]\text{CTP}$ durante 60 minutos en un ensayo de transcripción *in vitro* en presencia de los EC, tal y como se menciona en Materiales y Métodos.

a. Carril 1. ECT 60ug y Plax/Taq1 0.6ug.
Carril 2. ECi 40ug. Carril 3. ECi 40ug y Plax/Taq1 0.6ug. Carril 4. ECc 40ug.
Carril 5. ECc 40ug y Plax/Taq1 0.6ug.

b. Panel A. Densitometría del patrón en el carril 3 del autorradiograma en a. El mismo se realizó a 560nm.

Panel B. Densitometría del patrón en el carril 5 del autorradiograma en a. El mismo se realizó a 560nm.

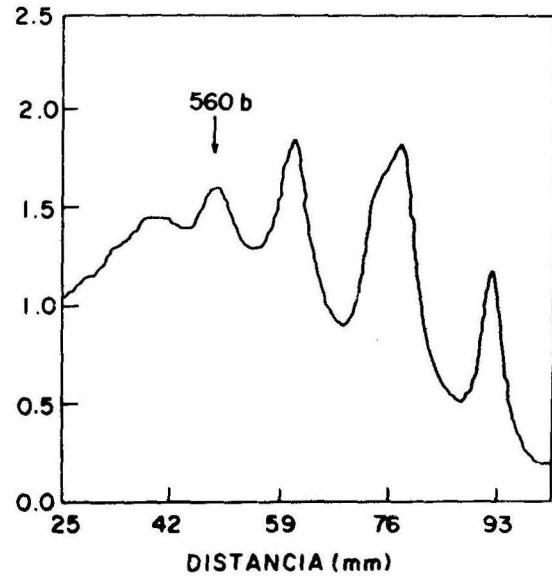
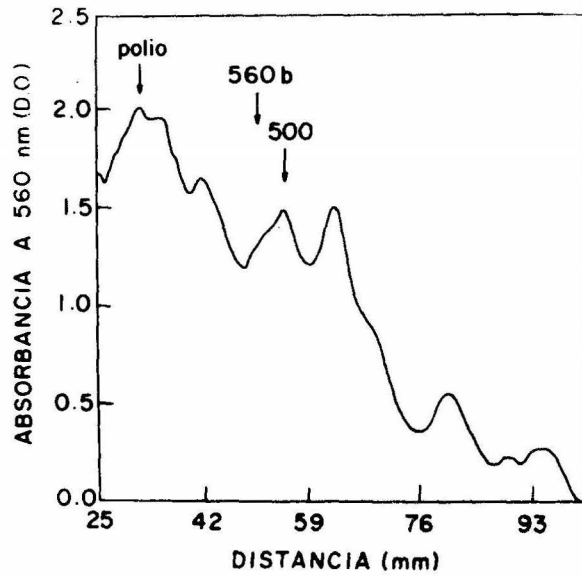
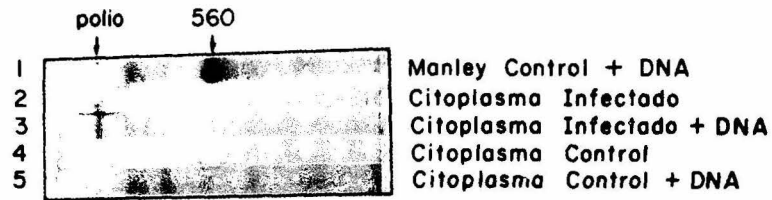


TABLA I
 TRANSCRIPCIÓN ESPECÍFICA CATALIZADA "IN VITRO" POR LOS EXTRACTOS CITOPLASMÁTICOS.¹

SISTEMA DE TRANSCRIPCIÓN		% TRANSCRITO ESPECÍFICO (³² P-RNA DE 560 BASES)	% DE TRANSCRITO ESPECÍFICO DEL CIT. INFECTADO EN RELACION AL CIT. CONTROL	
EXTRACTO ²	ORIGEN			
CELULAR TOTAL	CONTROL	100% ³		
CITOPLASMÁTICO	CONTROL	11.5%	100% ⁴	560b
CITOPLASMÁTICO	INFECTADO	9.2%	80%(?)	560b

1. La determinación se llevo a cabo por densitometría del autorradiograma descrito en la Figura 9 a 560nm.
2. La concentración de proteína en los extractos, celular total (Manley y cols. 1980) y citoplasmáticos (Flores-Otero y cols. 1982), fue de 60 y 40 ugr respectivamente.
3. El 100% corresponde al transcrito específico obtenido en la incubación con el extracto celular total (control).
4. El 100% corresponde al transcrito específico (560b) obtenido en la incubación con el extracto citoplasmático control.

7.-EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL EC SOBRE LA TRANSCRIPCIÓN ESPECÍFICA, DIRIGIDA POR EL PROMOTOR TARDÍO DE ADENO-2, EN PRESENCIA DEL ECT.

Los resultados anteriores sugieren que existen diferencias en la capacidad transcripcional de los EC, esto es, mientras que aparentemente el ECi es capaz de llevar a cabo la transcripción en forma inespecífica, no puede utilizar señales específicas de iniciación de un promotor fuerte, como es el promotor tardío de Adeno-2.

Este dato, aunque preliminar, sugiere que el ECi carece de proteínas que le dan especificidad para una región regulatoria, o bien que específicamente bloquea dichas señales. La primera posibilidad coincidiría con los resultados reportados (Crawford y cols. 1981; Velazquez, Tesis de Maestría 1986 y figura 9b), en cuanto a que los extractos obtenidos de células infectadas son deficientes en al menos un factor requerido para la iniciación específica. La segunda hipótesis, esto es, la presencia de un inhibidor se estudió ensayando el efecto de diferentes concentraciones del ECi sobre el sistema de transcripción control (ECT y Adeno-2). El experimento se realizó agregando al sistema de transcripción específicas cantidades crecientes del EC tanto control como el obtenido de células infectadas. El resultado se muestra en la figura 10(a y b). Como puede observarse en los carriles 2, 3

y 4 y en el panel A en 10 b, el ECc abate la transcripción total, llegándose a una inhibición absoluta al adicionar 30ugrs. de proteína (carril 5 en 10a). Este abatimiento, puede ser debido a un exceso de proteína en el sistema, el cual bloquea la interacción de la RNA polimerasa y los factores involucrados en la unión al DNA. Si comparamos con lo que sucede al suplementar al sistema cantidades crecientes de ECi encontramos una cinética muy similar a la descrita para el ECc (carril 6, 7, 8 y 9 y panel B en 10b). En este caso, también hay una disminución de la transcripción total a medida que aumenta la cantidad de ECi. La cuantificación del transcrito específico en la Tabla II, muestra, nuevamente, diferencias entre ambos extractos dado que, mientras a bajas concentraciones de EC añadido el efecto es muy parecido entre el control y el infectado, a 30ugrs. el abatimiento es mayor en presencia del extracto control.

Estos resultados, aunados a los descritos en la Figura 9, pueden sugerir la primera probabilidad mencionada, esto es, que el ECi es deficiente en un factor proteico requerido para la iniciación específica, dado que, el ECi, aparentemente, no puede llevar a cabo la iniciación dirigida por el promotor tardío de Adeno-2.

FIGURA 10. EFECTO DE LOS EXTRACTOS CITOPLASMATICOS SOBRE LA TRANSCRIPCION ESPECIFICA DEL PROMOTOR TARDIO DE ADENO-2. La autorradiografía muestra la incorporación de $[^{32}P]$ CTP en un ensayo de transcripción "in vitro", que se llevó a cabo durante 60 minutos, en presencia de diferentes cantidades de ECo y ECi, tal y como se menciona en Materiales y Métodos.

a. Todos los carriles contienen 60ug de ECT y 0.6ug de pLax/taqi; además los carriles 2, 3, 4 y 5 contienen 10ug, 15ug, 20ug y 30ug respectivamente de ECo y los carriles 6, 7, 8 y 9 contienen 10ug, 15ug, 20ug y 30ug respectivamente de ECi.

b. Panel A. Los carriles 2 (trazo superior) y 5 (trazo inferior) del autorradiograma fueron sometidos a una densitometria a 560nm.

Panel B. Los carriles 6 (trazo superior) y 9 (trazo inferior) del autorradiograma fueron sometidos a una densitometria a 560nm.

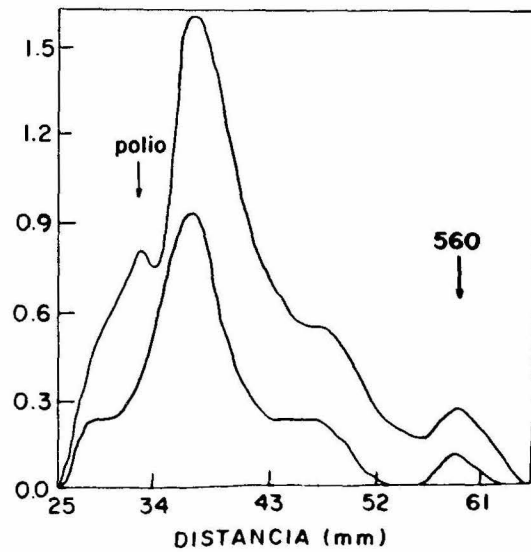
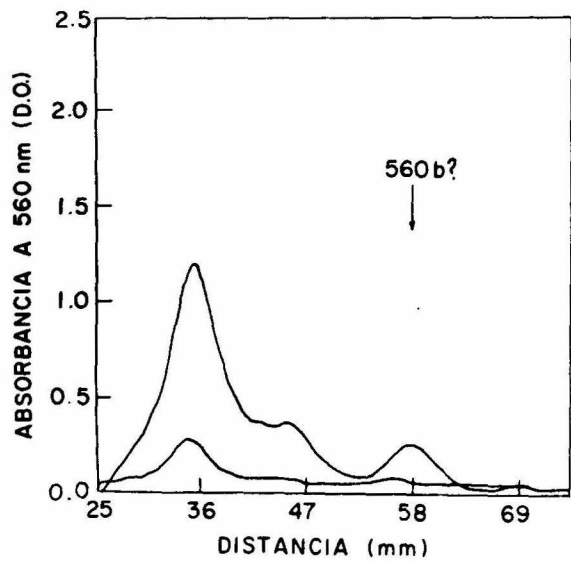
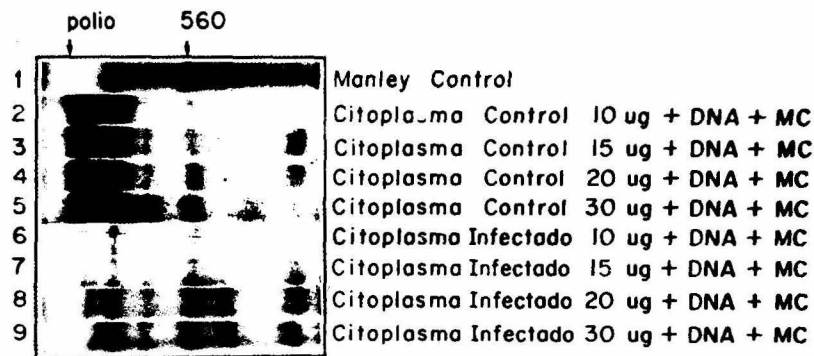


TABLA II
EFECTO DE LOS EXTRACTOS CITOPLASMATICOS SOBRE LA TRANSCRIPCION MEDIADA POR EL EXTRACTO CELULAR
TOTAL CONTROL.

INCUBACION		ADICIONES		% TRANSCRITO ESPECIFICO (³² P-RNA DE 560 BASES)	% TRANSCRITO ESPECIFICO DEL CIT. INFECTADO EN RALACION AL CIT CONTROL
EXTRACTO	+	EXTRACTO	ug PROTEINA		
CELULAR TOTAL	-	-	-	100 ²	-
CELULAR TOTAL		CIT. CONTROL	10	31.2	100 ³
CELULAR TOTAL		CIT. INFECT.	10	30.2	97.6
CELULAR TOTAL		CIT. CONTROL	30	.01	ND
CELULAR TOTAL		CIT. INFECT.	30	11.4	36

1. Los datos se obtuvieron de la densitometría del autoradiograma descrita en la Figura 10 a 560nm.
2. El 100% corresponde al transcrito específico obtenido con el Extracto Celular Total.
3. El 100% corresponde al transcrito específico (560b) obtenido en la incubación con el extracto citoplasmático control.

8. EFECTO DE LA PREINCUBACION DE LOS EC CON EL DNA SOBRE LA TRANSCRIPCION CATALIZADA POR EL ECT.

Los resultados anteriores en tanto muestran una posible deficiencia en los EC obtenidos de células infectadas, no parecen corroborar los datos en la literatura con respecto a la presencia de un inhibidor, probablemente codificado por el virus, en dichos extractos (Bossart 1984). Existen varias explicaciones sobre esta contradicción aparente (ver Discusión). Entre otras, que se requiriese que el inhibidor interactuase con el templado antes que la RNA polimerasa y los factores proteicos, se unieran al sitio específico en el promotor.

Para determinar si esta posibilidad era correcta, se preincubaron los EC con el templado antes de adicionar el ECT. Esto permitiría la formación de un "complejo estable" entre el putativo inhibidor y el DNA, sin la interferencia de las proteínas celulares.

Los experimentos de pre-incubación se llevaron a cabo con el DNA restringido, plásmido pLax, y el EC. Brevemente, el experimento consistió en pre-incubar al DNA con los EC durante diferentes tiempos (0, 10, 20 y 30 min.) y, posteriormente, adicionar al sistema el ECT y la mezcla de reacción conteniendo los nucleótidos. El resultado se muestra en la figura 11(a y b). A medida que aumenta el tiempo de preincubación entre el ECc y el templado (carril 6, 7, 8 y 9 y panel A en 11b), se incrementa el nivel de transcripción

total. Siendo así, se pueden observar alrededor de seis transcritos, mismos que se observan en el ensayo de transcripción del ECc y el DNA (Ver figura 9 carril 5), lo que implica que el tiempo de preincubación permite a elementos transcripcionales en el citoplasma control formar complejos estables con el DNA. En lo que se refiere al transcrito específico de 560 bases, éste, se incrementa con respecto al tiempo de preincubación; sin embargo no se comporta en forma diferencial con respecto a los otros transcritos.

En las preincubaciones con el ECI se observa un fenómeno similar, esto es, algunos transcritos se incrementan con respecto al tiempo y entre éstos está el de 560 bases (carril 2, 3, 4 y 5, panel B en 11b). Este resultado sugiere que el tiempo de preincubación permite a elementos transcripcionales que interactúan en forma inespecífica con el promotor, dejarlo libre para que en el momento que se suplementa al sistema con el ECT los factores de iniciación específica interactúen con el promotor en forma más eficiente. Sobre el incremento en los otros transcritos se explica de la misma manera que en el caso del ECc. El tiempo de preincubación permite una mejor interacción entre algunos elementos transcripcionales del extracto y el DNA.

Lo que es importante recalcar es que en ninguno de los dos casos, se encuentra un efecto específico sobre el transcrito de 560b, ya sea este de incremento o inhibición.

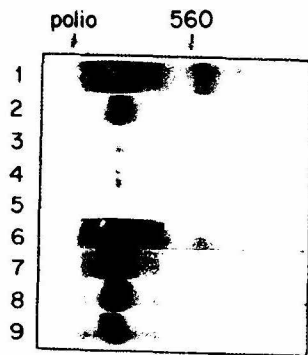
Por otro lado, tampoco existen diferencias marcadas entre los niveles de transcripción específica encontrada con el ECc y el ECi (ver Tabla III). Por lo tanto si existiese una actividad supresora de la transcripción no es posible detectarla en estas condiciones y tipo de ensayos.

FIGURA 11. PREINCUBACIONES CORTAS CON LOS EXTRACTOS CITOPLASMÁTICO. La autorradiografía muestra la incorporación de $[^{32}P]CTP$ durante el ensayo de transcripción "in vitro". La reacción se llevó a cabo durante 60 minutos tras preincubaciones de diferente longitud de tiempo entre los EC y el templado tal y como se menciona en Materiales y Métodos.

a. Carril 1. ECT 60ug y pLax/Taq1 .6 ug. Los carriles 2, 3, 4 y 5 tuvieron una preincubación de 0, 10, 20 y 30 minutos respectivamente entre el ECi 15ug y 0.6ug de pLax/Taq1, tras la cual se les agregó 60ug de ECT. Los carriles 6, 7, 8 y 9 tuvieron una preincubación de 0, 10, 20 y 30 minutos entre 12ug de ECc y 0.6ug de pLax/Taq1, tras la cual se agregó a la reacción 60ug de ECT.

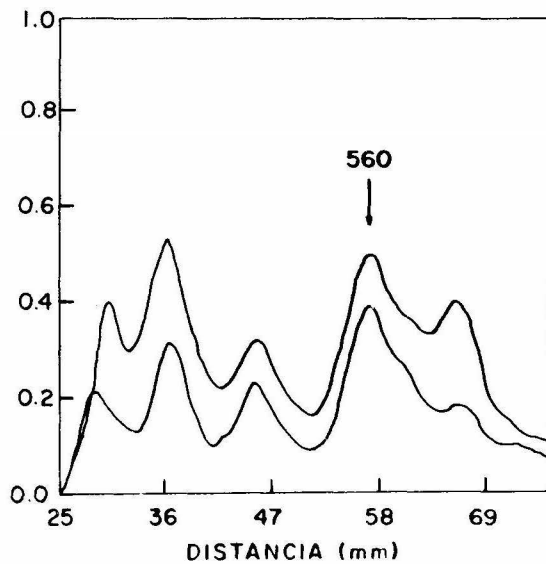
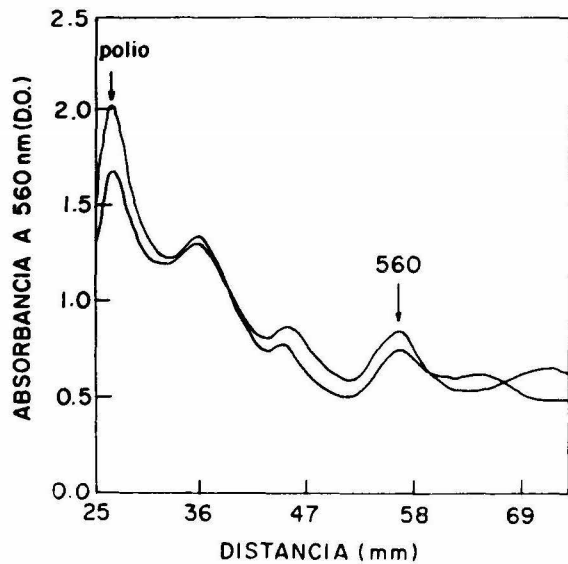
b. Panel A. Los carriles 3 (trazo inferior) y 5 (trazo superior) del autorradiograma fueron sometidos a una densitometría a 560nm.

Panel B. Los carriles 7 (trazo inferior) y 9 (trazo superior) fueron sometidos a una densitometría a 560nm.



Manley Control + DNA

- Citoplasma Infectado + DNA $0'$ MC
- Citoplasma Infectado + DNA $10'$ MC
- Citoplasma Infectado + DNA $20'$ MC
- Citoplasma Infectado + DNA $30'$ MC
- Citoplasma Control + DNA $0'$ MC
- Citoplasma Control + DNA $10'$ MC
- Citoplasma Control + DNA $20'$ MC
- Citoplasma Control + DNA $30'$ MC



Utilizando la misma estrategia que en el ensayo anterior se decidió probar si la actividad supresora requería de tiempos más largos de 30 minutos para ejercer su efecto.

Por lo que en este ensayo las preincubaciones fueron de 60 minutos con los extractos respectivos y el resultado de dicho experimento lo tenemos en la figura 12. Como se puede observar, al preincubar el DNA con el ECc (carril 2) por 60 minutos, se presentan las mismas bandas que en ensayos con preincubaciones más cortas, sin embargo se observan bandas menos definidas en el gel, esto lo adjudicamos a que preincubaciones tan largas deben de interferir con la transcripción del ECT. En el caso de la preincubación con el ECi (carril 3), excepto por el transcrito de polio que se observa bien definido, las otras bandas son difusas aunque coinciden con los ensayos de tiempos mas cortos . Posiblemente la causa sea la misma que en el extracto control.

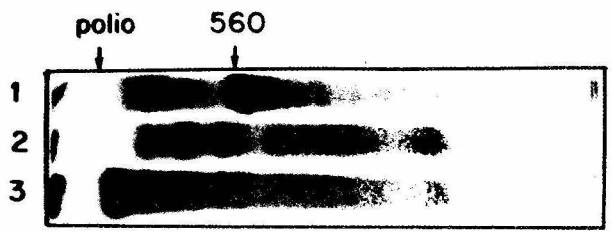
Una vez más en ninguno de los dos casos existe un efecto diferencial sobre la banda de 560 bases, así como tampoco pueden observarse diferencias en el porcentaje del transcrito específico con respecto al control (ECT+DNA) (Ver Tabla III).

Se puede decir que, de estar presente la actividad supresora de la transcripción en los extractos citoplasmáticos infectados, no ha sido posible detectar su

efecto en el sistema empleado de transcripción específica dirigida por el promotor tardío de Adeno-2, suplementado con un ECT.

FIGURA 12. PREINCUBACION DE LOS EXTRACTOS CITOPLASMATICOS POR TIEMPOS LARGOS. En la autorradiografía se muestra la incorporación de $[^{32}P]$ CTP, que se obtuvo en la transcripción "in vitro". La reacción se llevó a cabo durante 60 minutos después de preincubar 60 minutos los EC y el DNA, tal y como se menciona en Materiales y Métodos.

Carril 1. ECT 60ug y pLax/Taq1 0.6ug. En los carriles 2 y 3 se realizó una preincubación de 60 minutos con 12 y 15ug de los ECc y ECi respectivamente y 0.6ug de pLax/Taq1, tras la cual se agregaron 60ug de ECTy la mezcla de reacción.



Manley + DNA

Citoplasma Control + DNA^{60'} Manley Control

Citoplasma Infectado + DNA^{60'} Manley Control

TABLA III
 EFECTO DE LA PREINCUBACION DE LOS EXTRACTOS CITOPASMATICOS CON EL TEMPLADO SOBRE LA TRANSCRIPCION
 ESPECIFICA DEL EXTRACTO CELULAR TOTAL.

PREINCUBACION			INCUBACION ¹		%TRANSCRITO ESPECIFICO (³² P-RNA DE 560 BASES)
EXTRACTO	TIEMPO	ugPROTEINA	EXTRACTO	ugPROTEINA	
-	-	-	CELULAR TOTAL	60	100
CIT. CONTROL	10'	12	CELULAR TOTAL	60	42
CIT. INFECTADO	10'	15	CELUALR TOTAL	60	44
CIT. CONTROL	30'	12	CELULAR TOTAL	60	63.7
CIT. INFECTADO	30'	15	CELULAR TOTAL	60	68.1
CIT. CONTROL	60'	12	CELULAR TOTAL	60	32.2
CIT. INFECTADO	60'	15	CELULAR TOTAL	60	37

1. Tiempo en que se agregan los ribonucleotidos para iniciar la transcripción.
 La tabla resume los datos de las figuras 11 y 12.

9. SISTEMA DE TRANSCRIPCIÓN DE NÚCLEOS IN VITRO.

De los resultados anteriores se puede concluir, que tanto el ECc como el ECi, son deficientes para llevar a cabo la transcripción de un promotor eucariote, esto es, catalizan la síntesis dirigida por el PT-adeno-2, pero ésta es menos específica que la encontrada con el ECT, entendiendo por específica aquella que está dirigida por una región regulatoria (promotor) e inicia en el sitio indicado +1. También puede concluirse que el ECi no contiene un inhibidor específico de la transcripción DNA-dependiente, al menos en forma activa. Este último dato se contrapone con resultados reportados en la literatura.

Bossart en 1984 describió un sistema in vitro de núcleos purificados, los cuales al ser preincubados con extractos citoplasmáticos provenientes de células infectadas con poliovirus, presentaban de un 70 a un 80% de inhibición de la transcripción.

Las posibilidades que podrían explicar nuestros resultados con los EC sobre la transcripción son, o bien que bajo nuestras condiciones de ensayo el inhibidor no estuviese activo o bien que en nuestros ensayos no se encontrase el blanco del inhibidor. Con el fin de comparar el efecto del extracto sobre dos sistemas diferentes, se llevó a cabo la transcripción en núcleos aislados mediante el método de Roeder y cols. modificado en el laboratorio por Flores Otero y cols. (1982) para dectar preferencialmente la transcripción

dependiente de RNA polimerasa II. Brevemente las células infectadas durante 3 hrs. fueron rotas mediante varios golpes con homogenizador Dounce (Ver Materiales y Métodos) y los núcleos fueron obtenidos por una doble purificación a través de un colchón de glicerol al 30% en un amortiguador pH 7.9. Esta preparación de núcleos fue ensayada "in vitro" bajo condiciones experimentales que favorecen la transcripción por la RNA polimerasa II.

La actividad de síntesis de RNA medida en cpm por la incorporación de $[3\text{H}] \text{UMP}$ a la cadena creciente se muestra en la figura 13. A los 15 minutos de reacción el 71.73% de la incorporación es dependiente de la actividad de la RNA polimerasa II, este dato basado en la inhibición producida por $1 \mu\text{g/ml}$ de α -amanitina: en nuestro sistema. A los 30 minutos la incorporación dependiente de la RNA polimerasa II es de 68.18% (Ver Tabla IV).

Con estos datos comprobamos que el sistema estaba funcionando bien en nuestras manos y que podía ser utilizado para determinar el efecto de los EC sobre la síntesis de RNA dependiente de la polimerasa II.

FIGURA 13. TRANSCRIPCIÓN IN VITRO EN NÚCLEOS PURIFICADOS. La transcripción in vitro fue determinada en núcleos purificados (4×10^6 / ensayo), mediante la incorporación de [3 H] UMP durante 15 y 30 minutos tal y como se menciona en Materiales y Métodos.

En presencia de 1 μ g/ml de α -amanitina

Sin α -amanitina.

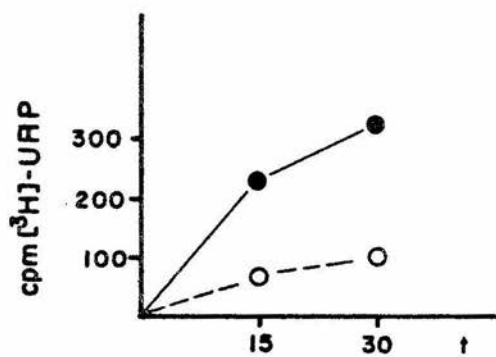


TABLA IV

TRANSCRIPCIÓN "IN VITRO" DEPENDIENTE DE RNA POLIMERASA II EN NUCLEOS PURIFICADOS

TIEMPO DE REACCION	TRANSCRIPCION DEPENDIENTE DE RNA POLIMERASA II. ¹
15'	71.73%
30'	68.18%

1. Medida como porcentaje de las cpm obtenidas en ausencia de -amanitina.

La tabla resume los datos descritos en la Figura 13.

11.EFECTO DE LOS EXTRACTOS CITOPLASMATICOS SOBRE LA TRANSCRIPCION "In Vitro", EN NUCLEOS PURIFICADOS.

Dados los antecedentes en la literatura (Bossart y cols.1984), los núcleos fueron preincubados con los EC durante 15 minutos antes de iniciar la reacción al agregar el [3]H UTP marcado, misma que se llevó a cabo durante 30 minutos. La incorporación de[3]H UMP al RNA sintetizado se determinó como cpm incorporadas a material ácido-insoluble (Ver Materiales y Métodos). El resultado de este experimento se muestra en la figura 14.

Como puede observarse, la transcripción en los núcleos se vió incrementada en un 172% al preincubar éstos con los ECc (100ug) (Ver Tabla V). Esto se puede deber a que con el ECc se le este proporcionando al sistema endógeno de transcripción, elementos limitantes en el núcleo. El sistema puede ser saturado como lo demuestra el hecho de que a medida que se aumenta la cantidad de extracto(200ug)(Ver Tabla V y figura 15) disminuye la estimulación en la transcripción.

Por otro lado, la preincubación con el extracto citoplasmático proveniente de células infectadas a dos concentraciones diferentes(50 y 100 ug), apenas alcanza niveles de 15% de incorporación de [3]H UMP, obteniéndose una inhibición completa al suplementar el sistema con 200ug de proteína en el ECi (Ver Tabla V).

Con este resultado comprobamos que el ECi presenta la actividad inhibitoria de la transcripción, corroborando los datos en la literatura (Bossart y cols 1984; Baladin y Franklin 1962).

Es importante hacer mención que en este sistema pudimos detectar dos tipos de efectos. El primero de ellos estimulador presente en el ECc y el otro supresor detectado en el ECi. Estos resultados parecen corroborar la diferencia del ECi mostrada en los ensayos de transcripción dirigida por el promotor tardío de adenovirus. La deficiencia del ECi en el efecto estimulador aunado a un efecto supresor sobre la RNA polimerasa II, podría explicar la diferencia tan drástica entre el efecto del ECc (172%) versus el ECi (15%).

FIGURA 14. PREINCUBACION DE LOS NUCLEOS CON LOS EXTRACTOS CITOPLASMATICOS. El efecto de los EC sobre la transcripción endógena de núcleos aislados (4×10^6) fue determinado después de preincubar los núcleos con los extractos durante 15 minutos (Ver Materiales y Métodos).

Núcleos control

Núcleos y ECc 100ug

Núcleos y ECc 200ug

Núcleos y ECI 50 y 100ug

Núcleos y ECI 200ug.

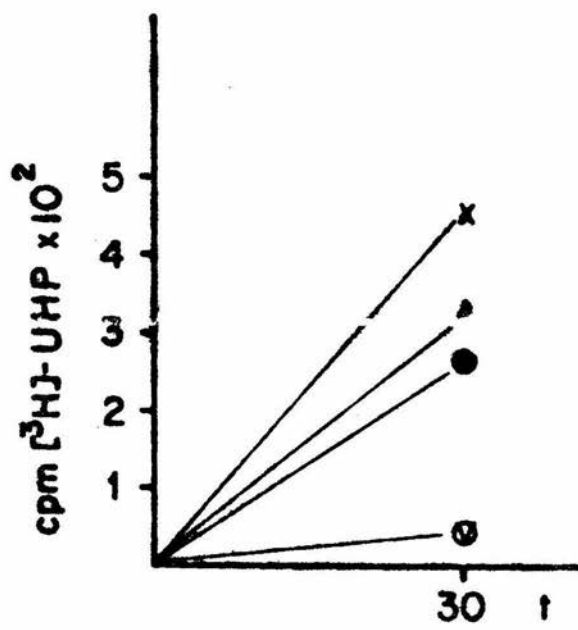


TABLA V

EFFECTO DE LA PREINCUBACION DE LOS NUCLEOS CON LOS EXTRACTOS CITOPLASMATICOS

EXTRACTO ADICIONADO AL SISTEMA DE NUCLEOS	ugPROTEINA	% DE INCORPORACION (³ H-UMP INCORPORADO A RNAm) ¹
-	-	100
CITOPLASMA CONTROL	100	172
CITOPLASMA CONTROL	200	124
CITOPLASMA INFECTADO	50	17
CITOPLASMA INFECTADO	100	17
CITOPLASMA INFECTADO	200	0

1. Medida como porcentaje de las cpm obtenidas en el ensayo de núcleos sin adición de extracto.

La tabla resume los datos descritos en la Figura 14.

DISCUSION

La síntesis de RNAm de células de mamífero, sufre un abatimiento tras la infección con cualquier tipo de picornavirus (Baltimore y Franklin 1962).

Dicho efecto no parece estar basado en la alteración de la velocidad de degradación del RNAm (Colby y cols. 1974), ni en una modificación del templado (Aprilletti 1978). Sin embargo, con respecto a alteraciones sufridas por la RNA polimerasa II tras la infección con polio, estudios recientes en nuestro laboratorio (Rangel y cols. enviado para su publicación) han demostrado que la subespecie I10 se modifica con una cinética idéntica a la de la inhibición de la transcripción.

Se ha sugerido que el efecto se da a nivel de iniciación, (Crawford y cols. 1981; Flores-Otero y cols. 1982; Bossart y cols. 1984).

Para tratar de entender los mecanismos moleculares involucrados en la supresión de la transcripción, decidimos abordar el problema utilizando como herramienta un sistema de transcripción "in vitro" capaz de iniciar específicamente.

Este sistema, consiste de un fragmento de DNA que contiene el promotor tardío de Adenovirus-2 y de un extracto celular total (ECT) (Manley y cols. 1980) que contiene factores de iniciación y a la RNA polimerasa II.

Crawford, en 1981 encontró, que un extracto total proveniente de células infectadas (ECTi), no era capaz de

promover la transcripción específica en un sistema de transcripción "in vitro", evidencia que fue corroborado en este trabajo (Figura 8). Al suplementar dicho ensayo con un extracto S-100, (extracto rico en factores de transcripción) proveniente de células control, Crawford encontró que la transcripción específica se restablecía.

Estos resultados implican que el ECTi es deficiente en algunos de los factores requeridos para la transcripción.

La ausencia de factores de iniciación se puede deber a varias causas: que no se sinteticen, que sean degradados o que estén siendo modificados durante la infección.

Ha sido reportado que extractos citoplasmáticos provenientes de células infectadas son capaces de inhibir la transcripción de núcleos aislados de células control (Baladin y Franklin 1964; Bossart y cols. 1982). Así mismo han sido localizados, durante la infección con polio, péptidos de posible origen viral (o inducidos durante infección) tanto en el núcleo como en el citoplasma (Fernandez-Tomas 1982; Bienz y cols. 1982; Bossart y cols 1984).

Por lo que, en este trabajo, decidimos utilizar los extractos citoplasmáticos provenientes de células infectadas, para así determinar, si es posible caracterizar el efecto inhibitorio de los mismos, en nuestro sistema de transcripción.

Como un control interno, decidimos utilizar al citoplasma proveniente de células tratadas bajo infección fingida

(control)(ECc). Nuestros resultados indican que este extracto interfiere seriamente con los elementos transcripcionales del extracto celular total(ECT) (Figura 10): consideramos que esta interferencia, se da en forma inespecifica, ya que tanto la transcripción a partir del promotor tardío de Adeno, como la que no se sintetiza a partir de éste, se ve abatida mientras mayor es la concentración de extracto agregado.

Este resultado implica que el sistema de transcripción "in vitro" reportado por Manley y cols. (1980), se encuentra limitado para poder llevar a cabo estudios sobre el efecto de los extractos citoplasmáticos, ya que a partir de cierta concentración de los mismos el sistema es abatido por interferencia proteica.

El extracto citoplasmático proveniente de células infectadas (ECi), interfiere también en forma inespecifica con la transcripción del ECT (Figura 10), aunque a mayores concentraciones del mismo, dicha interferencia es menor que la encontrada con el ECc (Tabla II).

Lo único concreto que se podría concluir sobre estos datos es que existen diferencias entre ambos extractos.

Así mismo, mientras que el ECc es capaz de sintetizar por si mismo el transcrito de 560 bases, en el ensayo con el ECi no se sintetiza el transcrito específico (Figura 9). Lo que aparte de corroborar que existen diferencias entre ambos extractos, sugiere que el ECi es deficiente en algún factor(es) involucrado en la transcripción específica, que

sustenta lo reportado por Crawford en 1981.

Si existiese un inhibidor en el ECI, el blanco podría ser o el templado o elementos transcripcionales presentes en el ECT.

Con el fin de investigar esto último y tomando en cuenta el antecedente de Bossart(1982), el cual requirió preincubar el ECI con núcleos para encontrar inhibición en la transcripción de los mismos, decidimos preincubar nuestros extractos con el templado y en experimentos paralelos en el laboratorio se preincubarón los extractos citoplasmáticos con el ECT.

No fue posible encontrar inhibición alguna ni en la preincubación con el templado ni con el ECT.

Tanto al preincubar el templado con el ECc como con el ECI, la transcripción total se incrementa (Figura 11) (con total nos referimos a la transcripción a partir del promotor tardío de Adenovirus y a la que no se sintetiza a partir de este). Posiblemente el tiempo de preincubación, permite a elementos transcripcionales presentes en los EC, formar complejos estables con el DNA.

En la preincubación con el ECT, se encuentra, tanto con el ECc, como con el ECI una disminución en la transcripción total (Velazquez, F. Comunicación personal), en este caso el efecto es similar a los ensayos sin preincubación en los cuales se abate la transcripción total por una probable interferencia protéica.

Nos hemos referido a la transcripción total y no a la específica, dado que en ningún caso se observa un efecto diferencial sobre el transcrito de 560 bases, por esto y por no encontrar diferencias en el patrón global de transcripción entre ambos extractos, concluimos que, en este tipo de ensayos, no es posible detectar una actividad inhibitoria en el ECI.

Algunas de las posibles causas para no haber encontrado la actividad inhibitoria son: que bajo las condiciones en las que se realizaron los ensayos, el inhibidor no se encuentre activo o que entre los elementos involucrados en nuestros ensayos no se encuentre el blanco del inhibidor.

Ya que el sistema hasta aquí utilizado presenta limitaciones propias para el estudio del efecto de los extractos citoplasmáticos sobre la transcripción, y ya que bajo las condiciones establecidas no fue posible detectar una actividad inhibitoria en el ECI, decidimos utilizar un sistema de transcripción de núcleos aislados de células no infectadas, como el que utilizó Bossart y cols (1984), persiguiendo el mismo objetivo, es es, tratar de entender los mecanismos moleculares involucrados en la inhibición de la transcripción.

Según lo reportado en la literatura (Bossart y cols. 1982), es necesario preincubar los núcleos con el ECI para encontrar inhibición en la transcripción de los mismos.

Nuestros resultados en los ensayos de preincubación de

los núcleos con el ECc y con el ECI muestran dos efectos diferentes: El ECc tiene un efecto estimulador sobre la transcripción endógena de los núcleos (Figura 14), lo que sugiere que el ECc, le está proporcionando al sistema factores transcripcionales. El efecto parece ser saturable, ya que, cuando la concentración protéica aumenta, la estimulación es menos drástica. Que no se mantenga un nivel de estimulación, sino que disminuya la transcripción, puede implicar una interferencia protéica a parte de la saturación.

Por otro lado, el ECI inhibe claramente la transcripción de núcleos aislados (Figura 14), incrementándose ésta a mayores concentraciones de proteína en el extracto y a mayor tiempo de preincubación, esto es, la inhibición presenta una cinética aditiva.

La pregunta que surge es: Cuáles son las diferencias entre ambos sistemas que permiten o no la actividad inhibitoria?

Existen varias respuestas, entre otras: 1. que el inhibidor no se encuentre en forma activa en los ECI durante los ensayos de transcripción "in vitro" dirigidos por el promotor tardío de Adeno-2; 2. que la estructura cromatinica sea necesaria para que el inhibidor se encuentre activo, dado que el blanco de la inhibición puede requerir formar parte de dicha estructura; y 3. que dentro de los elementos involucrados en los ensayos de transcripción "in vitro" dirigidos por el promotor tardío de Adeno-2, no se encuentre

el blanco de la inhibición.

Considerando que, la subespecies de la RNA polimerasa II que se ha detectado unida a cromatina activa en transcripción (García-Carranca y cols. 1984) es la IIO; que en el laboratorio (Rangel, enviado a su publicación), la misma, se ha encontrado modificada durante la infección con polio, con una cinética idéntica a la que presenta la inhibición de la transcripción; y que, utilizando la técnica de inmunotransferencia (Velazquez y Rangel, comunicación personal) se encontro que que el ECT contiene fundamentalmente, la subespecie IIA y en menor proporción a IIB, pero no a IIO. Sugerimos que la actividad inhibitoria presente en los extractos citoplasmáticos, provenientes de células infectadas, tiene como blanco de acción (ya sea en forma directa o indirecta) a la RNA polimerasa IIO; dado que, en tanto que los extractos citoplasmáticos de células infectadas inhiben la transcripción en núcleos integros, donde se detecta la subespecie IIO (mayoritaria) (Rangel y cols. enviado para su publicación), no tienen el mismo efecto sobre el ECT, donde la subespecie mayoritaria son la RNA polimerasa IIA y b.

BIBLIOGRAFIA

- Alonso, M.A. y Carrasco, L. (1981). Reversion by Hypotonic Medium of the Shutoff of Protein Synthesis induced by Encephalomyocarditis Virus. *J. of Virology*. 37: 535-540.
- Apriletti, J.W. y Penhoet, E.E. (1974). Recovery of DNA Dependent RNA Polymerase Activities from L Cells after Mengovirus Infection. *Virology*. 61: 597-601.
- Apriletti, S.W. y Penhoet, E.E. (1978). Cellular RNA Synthesis in Normal and Mengovirus Infected L-929 Cells. *J. Biol. Chem.* 253: 603-611.
- Arevalo-Gallegos, S.; Del Angel, R.M.; Zinker-Ruzal, S. y Fernández-Tómas, C. A Protein Complex, containing P1b, P1c and P1d Capsid Proteins associates to Viral Poliribosomes in Polio-infected HeLa Cells. (enviado para su publicación).
- Armstrong, J.A.; Edmonds, M.; Nakazato, H.; Phillips, B.A. y Vaughn, M. (1972). Polyadenylic Acid Sequences in the Virion RNA Poliovirus and Eastern Equine Encephalitis Virus. *Sci.* 176: 576-578.
- Bablanian, R. (1972). Depression of Macromolecular Synthesis in Cells Infected with Guanidine-Dependent Poliovirus under Restrictive Conditions. *Virology* 47: 225-259.
- Baladin, I.G. y Franklin, R.M. (1964). Biochemical and Biophysical Research Communication. 15: 27-32.
- Baltimore, D. y Franklin, R.M. (1962). The Effect of Mengovirus Infection on the Activity of the DNA-Dependent RNA Polymerase of L-Cells. *P.N.A.S. U.S.A.* 48: 1383-1390.
- Baltimore, D. y Girard, M. (1966). An Intermediate in the Synthesis of Poliovirus RNA. *P.N.A.S. U.S.A.* 56: 741-748.
- Baltimore, D.; Girard, M. y Darnell, J. (1966). Aspects of the Synthesis of Poliovirus RNA and the Formation of Virus Particles. *Virology* 29: 179-181.
- Baltimore, D. (1967). Structure of the Poliovirus Replication Intermediate RNA. *J. Mol. Biol.* 32: 359-368.
- Baltimore, D. (1969). The Replication of Picornavirus. In *The Biochemistry of Viruses*. (ed. H.B. Levy), Marcel Dekker, New York. pp. 101-176.
- Baron, M.H. y Baltimore, D. (1982a). Purification and Properties of a Host Cell Required for Poliovirus Replication "in vitro". *J. Biol. Chem.* 257: 12351-12358.

Baron, M.H. y Baltimore, D. (1982b). "In vitro" Copying of vira Positive Strand RNA by Poliovirus Replicase: Characterization of the Reaction and its Products. *J. Biol. Chem.* 257:12359-12366.

Baty, D.; Banera-Sablana, H.A.; Everett, R.D.; Vigneron, M. y Chambon, P. (1984). Mutational Dissection of the 21pb Repeat Region of the SV-40 Early Promoter Reveals that it Contains Overlapping Elements of the Early-Early and Late-Early Promoters. *Nucleic Acids Res.* 12:915-932.

Benoist, C.; O'Hare, K.; Breathnach, R. y Chambon, P. (1980). The Ovaalbumin Gene Sequence of Putative Control Regions. *Nucleic Acids Res.* 8:127-142.

Benoist, C.; Chambon, P. (1981). In vitro sequence requirements of SV 40 early Promotor Region. *Nature* 290 pp 304-310

Bensimhew, M.; Gabarro-Anpa, S.; Ehlich, R. y Reiss, C. (1983). Physical Characteristics in Eukaryotic Promoters. *Nucleic Acids Res.* 11:4521-4540.

Bernstein, H.D.; Sonenberg, N y Baltimore, D. (1985). Poliovirus Mutants that does not Selectively Inhibits Host Cell Protein Synthesis. *Mol. Cell. Biol.* 5:2913-2923.

Bienz, K.; Egger, D.; Rasser, Y. y Bossart, W. (1982). Accumulation of Poliovirus Proteins in the Host Cell Nucleus. *Intervirol.* 18:189-196.

Bossart, W.; Egger, D.; Rasser, Y. y Bienz, K. (1982). Poliovirus-induced Inhibition Studied in Isolated HEP-2 Cell Nuclei. *J. Gen. Virol.* 63:131-140.

Bossart, W.; Egger, D.; Rasser, Y. y Bienz, K. (1984). Accumulation of Poliovirus Proteins in Uninfected Isolated HEP-2 Cell Nuclei "in vitro". *Intervirol.* 21:150-158

Bradbury, E.M.; McClean, N. y Mathews, H.R. (1981). DNA Chromatin and Chromosomes. Blackwell Scientific Publications. Oxford. pp.231-266.

Brady, J.N.; Radonovich, M.; Vodkin, M.; Natarajan, V.; Thoren, M.; Das, G.; Janik, J. y Salzman, N.P. (1981). Site-base Substitution and Deletion Mutations that Enhance or Suppress Transcription of the SV-40 Major Late RNA. *Cell.* 31:624.

Briendl, M. (1971b). The Structure of Heated Poliovirus Particles. *J. Gen. Virol.* 147: 156-160

Byrne, B.J.; Davis, M.S.; Yamaguchi, J.; Bergsma, D.J. y Subramanian, K.N. (1983). Definition of the SV-40 Early Promoter Region and Demonstration of a Host Range Bias in the Enhancement Effect of the Simian Virus 40 72-base-pair Repeat. P.N.A.S. U.S.A. 80:721-725.

Cantero-Aguilar, L.; Sanchez-Trujillo, A. y Fernández-Tómas, C. Poliovirion-derived Capsid Proteins in Subviral Ribonucleoprotein Complexes. Virology en prensa.

Capecchi, M.R.; Luciw, P.A.; Bishop, J.M. y Varmus, H.E. (1983). Location and Function of Retroviral and SV-40 Sequences that Enhance Biochemical Transformation after Microinjection of DNA. En "Current Communication of Molecular Biology: Enhancers and Eukaryotic Gene Expression (Y. Gluzman y T. Shenk Edits.). CSHL. pp.101-102

Carrasco, L. y Smith, A.E. (1976). Sodium Ions and the Shut-off of Host Cell Protein Synthesis by Picornavirus. Nature (London). 264:807-809.

Colby, D.S.; Finnerty, V. y Lucas-Lenard, J. (1974). Fate of mRNA of L-cells Infected with Mengovirus. J. Virol. 13:858-869.

Crawford, N.; Fire, A.; Samuels, M.; Sharp, P.A. y Baltimore, D. (1981). Inhibition of Transcription Factor Activity by Poliovirus. Cell. 27:555-561.

Dahmus, M.E. y Kedinger, C. (1983). Transcription of Adenovirus Major Late Promoter Inhibited by Monoclonal Antibody Directed against RNA Polimerase II α and II β . J. Biol. Chem. 258:2303-2307.

Dasgupta, A.; Zabel, P. y Baltimore, D. (1980). Dependence of the Activity of Poliovirus Replicase on a Host Cell Protein. Cell. 19:423-429.

Dasgupta, A. (1983). Purification of Host Factor Required for "in vitro" Transcription of Poliovirus RNA. Virology. 127:245-251.

Davis, B.D.; Dulbecco, R.; Eisen, H.E. y Ginsberg, H.S. (1980). Picornaviruses. 3th ed. Harper y Row eds. Hagerstown, Maryland U.S.A. 1096-1176.

Davison, B.L.; Egly, J.M.; Mulvihill, E.R. y Chambon, P. (1983). Formation of Stable Preinitiation Complexes between Eukariotic class B Transcription Factors and Promotor Sequences. Nature. 301:680-686.

- Dignam, J.D.; Lebovitz, R.M. y Roeder, R.G. (1983a). Accurate Transcription Initiation by RNA Polymerase II in a Soluble Extract from isolated mammalian Nuclei. *nuclei Acids Res.* 11:1475-1489.
- Dignam, J.D.; Martin, P.L.; Shastry, B.S. y Roeder, R.G. (1983b). Eukaryotic Gene Transcription with Purified Components. *Meth. Enzymol.* 101:582-598.
- Dynan, W.S. y Tjian, R. (1983a). Isolation of Transcription Factors that Discriminate between Different Promoters Recognized by RNA Polymerase II. *Cell.* 32:569-880.
- Dynan, W.S. y Tjian, R. (1983b). The Promotor-specific Transcription Factor SP1, Binds to Upstream Sequences in the SV-40 Early Promoter. *Cell.* 35:79-87.
- Egly, J.M.; Miyamoto, N.G.; Mancollin, V. y Chambon, P. (1984). Is Actin a Transcription Initiation Factor for RNA Polymerase B? *EMBO J.* 3 no. 10:2363-2371.
- Ehrenfeld, E. (1982). Poliovirus-induced Inhibition of Host-cell Protein Synthesis. *Cell.* 28:435-436.
- Ehrenfeld, E. (1985). Fourth meeting of the European group of Molecular Biology of Picornaviruses.
- Emini, E.A.; Leibowitz, J.; Diamond, D.; Bonin, J. y Wimmer, E. (1984). Recombinants of Mahoney and Sabin Strain Poliovirus Type 1: Analysis of "in vitro" Phenotypic Markers and Evidence that Resistance to Guanidine maps in the Non-structural Proteins. *Virology.* 137:74-85.
- Everett, R.D.; Baty, D. y Chambon, P. (1983). The Repeated GC-rich Motifs Upstream from the TATA Box are important Elements of the SV-40 Early Promoter. *Nucleic Acids Res.* 11:2447-2467.
- Fanell, P.J.; Deininger, P.L.; Bankier, A. y Banel, B. (1983). Homologous Upstream Sequences near Epstein-Barr Virus Promoters. *P.N.A.S. U.S.A.* 80:1565-1569.
- Fernández-Tómas, C. y Baltimore, D. (1973). The Morphogenesis of Poliovirus II: Demonstration of a new Intermediate: The Provirion. *J. Virol.* 12:1122-1130.
- Fernández-Tómas. (1982). The Presence of Viral-induced Proteins innuclei from Poliovirus infected HeLa Cells. *Virology.* 116:629-634.

Flanegan, J.B.; Petterson, R.F.; Ambros, U.; Hewlett, M.J. y Baltimore, D. (1977). Covalent Linkage of a Protein to a Defines Nucleotide Sequence at the 5' Terminus of Virion and Replicative Intermediate RNAs of Poliovirus. P.N.A.S. U.S.A. 74:961-965.

Flores-Otero, G.; Fernández-Tómas, C. y Gariglio-Vidal, P. (1982). DNA-Bound Polymerase during Poliovirus Infection: Reduction in the Number of Form II Enzyme Molecules. Virology. 116:619-628.

García-Carranca, A.; Miguel, F.; Dahmus, M. y Gariglio-Vidal, P. (1984) Structure of RNA Polymerase II in Transcriptionally Active Genes. (Enviado para su publicación).

Gariglio-Vidal, P.; Buss, J. y Green, M.H. (1974). Sarkosyl Activation of RNA Polymerase Activity in Mitotic Mouse Cells. FEBS. Lett. 44:330-333.

Gariglio-Vidal, P. (1976). Effect of Sarkosyl on Chromatin and Viral RNA Synthesis. Differentiation. 5:1879-183.

Green, M.H. y Gariglio-Vidal, P. (1975). Activation of Nuclear RNA Polymerase by Sarkosyl. Eur. J. Biochem. 53:217-225.

Hager, G.L.; Lichtler, A.C. y Ostrowski, M.C. (1983). The MMTV Glucocorticoid Regulatory Sequence: A Positive or Negative Element? EN "Current Communication in Molecular Biology Expression" (Y. Gluzman y T. Shenk Edits.). CSHL. pp. 161-164.

Hanecak, R.; Semler, B.L.; Ariga, H.; Anderson, C.W. y Wimmer, E. (1984). Expression of a Cloned Gene Segment of Poliovirus in E. coli: Evidence for Autocatalytic Production of the Viral Proteinase. Cell. 37:1063-1073.

Hearing, P. y Shenk, K.T. (1984). A Duplicated Enhancer Element within the Adenovirus Type-5 E1A Transcriptional Control Region. En "Current Communications in Molecular Biology: Enhancers and Eukaryotic Gene Expression". Y. Gluzman y T. Shenk Edits.). CSHL. pp.91-94.

Hen, R.; Sassone-Corsi, P.; Corden, J.; Gaub, M.P. y Chambon, P. (1982). Sequences Upstream from TATA Box are Required "in vivo" and "in vitro" for Efficient Transcription from the Adenovirus Serotype 2 Major Late Promoter. P.N.A.S. U.S.A. 79:7132-7136.

Holland, J.J. y Mc Laren, L.C. (1959). The Mammalian Cell-virus Relationship. J. Exp. Med. 109:407-504.

Horikoshi, M.; Sekimizu, K. y Natori, S. (1984). Analysis of the Stimulatory Factor of RNA Polymerase II in the Initiation and Elongation Complex. *J. Biol. Chem.* 254:608-611.

Hu, S.L. y Manley, J.L. (1981). DNA Sequence Required for Initiation of Transcription "in vitro" from the Major Late Promoter of Adenovirus 2. *P.N.A.S. U.S.A.* 78:820-824.

Ingles, C.J.; Himmelfarb, H.J.; Shales, M.; Greenleaf, A.L. y Friesen, J.D. (1984). *P.N.A.S. U.S.A.* 81:2157-2161.

Jacobson, M.F. y Baltimore, D. (1968). Polypeptide Cleavages in the Formation of Poliovirus Proteins. *P.N.A.S. U.S.A.* 61:77-84.

Jacobson, M.F.; Asso, J. y Baltimore, D. (1970). Further Evidence on the Formation of Poliovirus Proteins. *J. Mol. Biol.* 49:657-669.

Jongstra, J.; Reudel, T.L.; Huber, R.S.; Oudet, P.; Benoist, C.; Chae, C.B.; Jeltsch, J.M.; Mathis, D.J. y Chambon, P. (1989). Induction of Altered Chromatin Structure by Simian Virus 40 Enhancer and Promoter Elements. *Nature.* 307:708-714.

Jove, R. y Manley, J.L. (1984). In Vitro Transcription from the Adenovirus 2 Major Late Promoter Utilizing Templates Truncated at Promoter-proximal Sites. *J. Biol. Chem.* 259:8513-8521.

Kitamura, W.; Semler, B.L.; Rothberg, P.G.; Larsen, G.R.; Adler, C.J.; Dorner, E.A.; Emini, E.A.; Hanecak, K.R.; Lee, J.J.; Vander Welf, S.; Anderson, C.W. y Wimmer, E. (1981). Primary Structure, Gene Organization and Polypeptide Expression of Poliovirus RNA. *Nature.* 291:547-553.

Krah, D.L. y Crowell, R.L. (1982). A Solid Phase Assay of Solubilized HeLa Cell Membrane Receptors for Binding Group B Coxsackieviruses and Polioviruses. *Virology.* 118:148-156.

Laimins, L.A.; Kessel, M.; Rosenthal, N. y Khoury, G. (1983). Viral and Cellular Enhancer Elements. En "Current Communication in Molecular Biology Enhancers and Eukaryotic Gene Expression". (y. Gluzman y T. Shenk Edits.). CSHL. pp. 28-37.

Lee, D.C.; Roeder, R.G. y Wold, S.M. (1982). DNA Sequences affecting Specific Initiation of Transcription "in vitro" from the E111 Promoter of Adenovirus 2. *P.N.A.S. U.S.A.* 79:641-652.

Lonberg-Holm, K. (1975). The Effects of Concanavalin A on the

Early Events of Infection by Rhinovirus Type 2 and Poliovirus Type 2. *J. Gen. Virol.* 28:313-327.

Luria, S.E.; Darnel Jr., J.E.; Baltimore, D. y Campbell, A. (1976). *General Virology*. John Wiley & Sons. 3a Edición.

Lowry, O.H.; Reosenbrough, U.J.; Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951). Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.

Madshus, I.H.; Olsnes, S. y Sandving, K. (1984). Mechanism of Entry into Cytosol of poliovirus Type1: Requirement for Low pH. *J. Cell. Biol.* 98:1194-1200.

Manley, J.L.; Fire, A.; Cano, a.; Sharp, P.A. y Gelfer, M.L. (1980). DNA Dependent Transcription of Adenovirus Genes in a Soluble Whole-cell Extract. *P.N.A.S. U.S.A.* 74:3855-3859.

Mathis, D.J. y Chambon, P. (1981). The SV-40 Early Region TATA Box is Required for Accurate "in vitro" Initiation of Transcription. *Nature.* 290:310-315.

Matsui, T.; Segal, J.; Weil, P.A. y Roeder, R.G. (1980). Multiple Factors Required for Accurate Initiation of Transcription by Purified RNA Polymerase II. *J. Biol. Chem.* 255:11992-11996.

Mishoe, H.; Brady, J.N.; Radonovich, M. y Salzman, P. (1984). Simian Virus 40 Guanine-Cytosine-Rich Sequences Function as Independent Transcriptional Control Elements in Vitro. *Mol. and Cel. Biol.* 4. no12 2911-2920.

Morrow, C.D.; Hocko, J.; Navab, M. y Dasgupta, A. (1984b). ATP is Required for Initiation of Poliovirus RNA Synthesis in vitro: Demonstration of Tyrosine-phosphate Linkage between in vitro Synthesized RNA and Genome-linked Protein. *J. Virol.* 50:515-523.

Morrow, C.D.; Gibbons, G.F. y Dasgupta, A. (1985). The Host Protein Required for "in vitro" Replication of Poliovirus is a Protein Kinase that Phosphorylates Eukaryotic Initiation Factor-2. *Cell.* 40:913-921.

Nair, C.N. (1984). Na and K Changes in Animal Virus-infected HeLa Cells. *J. Gen. Virol.* 65:1135-1138.

Nevins, J.R. y Chen-Kiang, S. (1981). Processing of Adenovirus Nuclear RNA to mRNA. En "Advances in virus reaserch". 26:1-35.

Núñez, M.E. (1984). Analisis de proteíñas en nucleos al
slados bajo infección con el virus de la poliometitis. Tesis de

Licenciatura. U.N.A.M. E.N.E.P. Iztacala. México. D.F.

Oberg, B y Philipson, L. (1971). Replicatives Structure of Poliovirus RNA "in vitro". J. Mol. Biol. 58:725-737.

Pallansch, M.A.; Kew, D.M.; Semler, B.L.; Omilianowski, D.R.; Anderson, C.W.; Wimmer, E. y Ruckert, R. (1984). Protein Processing Map of Poliovirus. J. Vir. 49. no.3:873-880.

Pelham, H.R.R. (1982). A Regulatory Upstream Promoter Element in the Drosophila Hsp70 Heat-Shock Gene. Cell 30:517-528.

Rangel, L.M.; Fernández-Tómas, C.; Dahmus, M.E. y Gariglio-Vidal, P. Modificación de RNA Polymerase II0 Subespecie after Poliovirus Infection. (enviado para su publicación).

Roeder, R.G. (1976). Eukaryotic Nuclear RNA Polymerase. En "RNA Polymerase". (Edit. Losick y Chamberlin). Cold Spring Harbor Laboratory. New York. pp. 285-330.

Rose, J.K.; Trachsel, H.; Leong, K. y Baltimore, D. (1978). Inhibition of Translation by Poliovirus: Inactivation of a Specific Initiation Factor. P.N.A.S. U.S.A. 75:2732-2736.

Ruckert, R.A. (1976). Picornaviruses, en "Comprehensive Virology, (Fraenkel-Conrat and Wagner eds.), Plenum Publishing Corp. N.Y. 6:131.

Ruckert, R.R. y Wimmer, E. (1984). Systematic Nomenclature of Picornavirus Proteins. J. Virol. 50:957-959.

Saborio, J.L.; Pong, S.S. y Koch, G. (1974). Selective and Reversible Inhibition of Initiation of Protein Synthesis in Mammalian Cells. J. Mol. Biol. 85:195-211.

Samuels, M.; Fire, A. y Sharp, P.A. (1982). Separation and Characterization of factors Mediating Accurate Transcription by RNA Polymerase II. J. Biol. Chem. 257:14419-14427.

Sanchez, T.A. Tesis de Licenciatura. U.N.A.M. E.N.E.P. Iztacala. México.

Sassone Corsi, P.; Corden, J.; Kedingner, C. y Chambon, P. (1981) Promotion of Specific "in vitro" Transcription by TATA Box Sequences Inserted in a Forcing Nucleotide Environment. Nucleic Acids Res. 9:3941-3985.

Scholer, H.R. y Gruss, P. (1984). Specific Interaction between Enhancer-containing Molecules and Cellular Components. Cell. 36:403-411.

Shwartz, L.B.; Lawrence, C.; Thach, R.E. y Roeder, R.G. (1974). Encephalomyocarditis Virus Infection of Mouse Plasmacytoma Cells. *J. Virol.* 14:611-619.

Sekimizu, K.; Nakanishi, Y.; Mizuno, D. y Natori, S. (1979). Purification and Preparation of antibody to RNA Polymerase II Stimulatory Factors from Ehrlich Ascites Tumor Cells. *Biochemistry.* 18:1582-1588.

Sekimizu, K.; Kubo, Y.; Segawa, K y Natori, S. (1981). Difference in Phosphorylation of two Factors Stimulating RNA Polymerase of Ehrlich Ascites Tumor Cells. *Biochem.* 20:2286-2292.

Semler, B.L.; Hanecak, R.; Dorner, L.F.; Anderson, C.W. y Wimmer, E. (1983). Poliovirus RNA Synthesis "in vitro": Structural Elements and Antibody Inhibition. *Virology.* 126:624-635.

Slattery, E.; Dignam, J.D.; Matsui, T. y Roeder, R.G. (1983). Purification and Analysis of a Factor which Suppresses Nick-induced Transcription by RNA Polymerase II and its Identify with Poly (ADP-ribose) Polymerase. *J. Biol. Chem.* 258:5955-5959.

Steiner-Fryer, A. y Cooper, P.D. (1973). Temperature-sensitive Poliovirus Mutants Defective in Repression of Host Protein Synthesis are also Defective in Structural Protein. *J. Gen. Virol.* 21:215-225.

Takegami, T.; Kuhn, R.J.; Anderson, C.W. y Wimmer, E. (1983). Membrane-dependent Uridylation of the Genome Linked Protein of VPg. *P.N.A.S. U.S.A.* 80:7447-7451.

Takegami, T.; Semler, B.L.; Anderson, C.W. y Wimmer, E. (1983). Membrane Fractions Active in Poliovirus RNA Replication Contain VPg Precursor Polypeptides. *Virology.* 128:33-47.

Thach, S.S.; Dobbertin, D.; Lawrence, C.; Golini, F. y Thach, R.E. (1974). The Mechanism of Viral Replication Complexes of Encephalomyocarditis Virus. *P.N.A.S. U.S.A.* 71:2549-2553.

Toyoda, H.; Nicklin, M.J.H.; Murray, M.; Anderson, C.; Dunn, J.; Studier, F.W. y Wimmer, E. (1986). *Cell.* 45: 761-770.

Treisman, R. y Maniatis, T. (1985). Simian Virus 40 Enhancer Increases Number of RNA Polymerase II Molecules on Linked DNA. *Nature (London).* 315:72.

Tsuda, M. y Suzuki, Y. (1981). Faithful Transcription Initiation of Fibroin Gene in a Homologous Cell-free System

Reveals an Enhancing Effect of 5' Flanking Sequence far Upstream. *Cell*. 27:175-182.

Ueno, K.; Sakimizu, K.; Obinata, M.; Mizuno, D. y Natori, S. (1981). Stimulation of Messenger Ribonucleic Acid Synthesis in Isolated Nuclei by a Protein that Stimulates RNA Polymerase II. *Biochem.* 20:634-640.

Van Dyke, T.A., Rickles, R.J. y Flanagan, J.B. (1982). Genome Length Copies of Poliovirus RNA are Synthesized "in vitro" by the Poliovirus RNA-dependent RNA Polymerase. *J. Biol. Chem.* 257:4610-4617.

Verma, I.M.; Jolly, D.J. y Friedmann, T. (1983). Enhancer Element in Murine Long Terminal Repeats. En "Current Communication of Molecular Biology. Enhancers and Eukaryotic Gene Expression". (Y. Gluzman y T. Shenk Edits.). CHSL. pp. 101-102.

Wasylik, B.; Derbyshire, R.; Guy, A.; Moko, D.; Roget, A.; Tecule, R. y Chambon, P. (1980B). Specific "in vitro" Transcription of Conalbumin Gene is Drastically Decreased by Single-point Mutation in TATA Box Homology Sequence. *P.N.A.S. U.S.a.* 77:7024-7028.

Wasylik, B.; Wasylik, C.; Augereau, F. y Chambon, P. (1983). The SV40 72bp. Repeat Preferentially Potentiates transcription Starting from Proximal Natural or Substitute Promoter Elements. *Cell*. 32:503-514.

Weber, F.; De Villiers, J. y Schaffner, W. (1984). an SV40 "Enhancer Trap" incorporates exogenous Enhancers or generates Enhancers from its own Sequences. *Cell* 36:983-992.

Weil, P.A.; Luse, D.S.; Segall, J. y Roeder, R.G. (1979b). Selective and Accurate Initiation of Transcription at the Ad-2 Major Late Promoter in a Soluble System Dependent on Purified RNA Polymerase II and DNA. *Cell*. 18:469-484.

Weber, F. y Schaffner, W. (1985). Simian Virus 40 Enhancer Increases RNA Polymerase Density within the Linked Gene. *Nature(London)*. 315:75.

Weinmann, R.; Ackerman, S.; Bunick, D.; Conano, M. y Zandomeni, R. (1983). In vitro Transcription of Adenovirus Genes. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 109:125-145.

Woo-Yeon, K. y Dahmus, M.E. (1986). Immunochemical Analysis of Mammalian RNA Polymerase II Subspecies: Stability and Relative "in vivo" Concentration. (enviado para su publicación).

Wright, P.J. y Cooper, P.D. (1974). Poliovirus Proteins Associated with Ribosomal Structures in Infected Cells.

Zeichhart, H.; Wetz, K.; Willingmann, P. y Habermahl, K.D. (1985). Entry of Poliovirus type 1 and Mouse Elberfeld (ME) Virus into Hep-2 Cells: Receptor mediated Endocytosis and Endosomal or Lysosomal Uncoating. J. Gen. Virol. 66:483-493.