



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES IZTACALA

**PRESENCIA DEL "GAP" EN MINICROMOSOMAS DE SV40
ACTIVOS EN REPLICACION Y TRANSCRIPCION**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A

TERESA EDITH GARAY ROJAS

México, D. F.

1986



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.

Esta tesis se realizó bajo la asesoría de la Dra. Annick Chestier y del Dr. Patricio Gariglio, profesores del depto. de Genética y Biología Molecular del C.I.N.V.E.S.T.A.V. del I.P.N.

A mis Padres

Everisto y Olga.

A mis hermanos

Alejandro, Maria Eugenia, Estela,
Jorge, Leticia, Juan Carlos.

A mi abuela

Rita.

A mis compañeros de laboratorio

Consuelo, Mauricio, Rodolfo, René, Francisco,

Pedro, Alejandro, Silvia y Floriberto.

Y de manera muy especial

a Rocio e Iván.

INDICE.

SIMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	1
INDICE DE FIGURAS.....	3
RESUMEN.....	5
I.-INTRODUCCION.....	8
Estructura de la cromatina activa en replicación.....	11
Estructura de la cromatina activa en transcripción... ..	16
Virus de Simio 40.....	21
Replicación Viral.....	25
Transcripción de SV40.....	26
GAP.....	28
II.-OBJETIVO.....	35
III.-MATERIALES Y METODOS.....	36
Cultivo de células CV1.....	36
Propagación del virus SV40.....	36
Extracción de DNA por el método de Hirt.....	37
Cuantificación de DNA por el método de Burton.....	38
Purificación de DNA de SV40.....	39
Extracción de complejos nucleoproteicos de SV40.....	39
A.-Infección.	
B.-Marcaje de células CV1.	
Digestion de complejos con enzimas de restricción....	43

Transcripción in vitro de minicromosomas de SV40.....	44
Electroforesis en geles de agarosa.....	47
Fluorografía en geles de agarosa.....	48
Presensibilización de películas.....	48
IV.-RESULTADOS.....	50
PRESENCIA DE LA ESTRUCTURA GAP EN MINICROMOSOMAS ACTIVOS EN REPLICACION .	
Purificación de minicromosomas de SV40.....	50
Patrón de restricción de minicromosomas maduros con las enzimas Eco RI y Bam HI.....	53
Purificación de minicromosomas activos en replicación.....	57
Relación entre el GAP y los minicromosomas activos en replicación.....	63
Análisis de minicromosomas que recién completaron su replicación.....	67
PRESENCIA DEL GAP EN MINICROMOSOMAS ACTIVOS EN TRANSCRIPCION.....	73
V.-DISCUSION.....	81
VI.-REFERENCIAS.....	87

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.

P-CTP.- Citidín Trifosfato marcado con ^{32}P en posición α .

DNA.- Acido desoxiribonucléico.

DTT.- Ditiotreitól.

EDTA.- Acido Etilendiaminotetracético.

Kd.- Kilodaltones.

pb.- Pares de bases.

PM.- Peso Molecular.

PMSF.- Fenilmetilsulfonilfluoruro.

POPOP.- 1,4-bis-2-(5-feniloxazolil)-benceno.

PPO.- 2,5-difeniloxazol.

P/V.- Relación peso a volumen.

RNA.- Acido Ribonucléico.

RNA_m.- RNA mensajero.

rpm.- Revoluciones por minuto.

Sarkosyl.- Lauril Sarcosinato de Sodio.

SDS.- Dodecil Sulfato de Sodio.

TEA-HCl.- Trietanolamino-Hidrocloruro.

TCA.- Acido Tricloroacético.

Tris-HCl.- Trisa(hidroximetil)-aminometano-hidrocloruro.

U.- Unidades.

UFP.- Unidades formadoras de placa.

U.M.- Unidades de Mapa.

INDICE DE FIGURAS.

FIG.		PAG.
1	Microfotografía electrónica de cromatina activa en replicación.	13
2	Microfotografía electrónica de minicromosomas de SV40 activos en transcripción.	17
3	Mapa físico de SV40.	23
4	Microfotografía electrónica en campo oscuro de minicromosomas de SV40.	30
5	Secuencias comprendidas dentro de la región GAP.	33
6	Esquema general I.	41
7	Esquema general II.	45
8	Patrón de sedimentación de complejos nucleoproteicos de SV40.	51
9	Sensibilidad de minicromosomas maduros a la enzima de restricción BglI.	55
10	Patrón de restricción de minicromosomas maduros de SV40 digeridos con las enzimas BglI, Eco RI y Bam HI.	58
11	Perfil de sedimentación de minicromosomas maduros y activos en replicación.	61
12	Patrón de restricción de minicromosomas activos en replicación digeridos con la enzima BglI.	63

13	Complejos nucleoprotéicos activos en replicación digeridos con las enzimas BglI, Eco RI y Bam HI.	68
14	Sensibilidad a la enzima BglI de minicromosomas activos en replicación después de una caza de 10 minutos.	71
15	Sensibilidad a la enzima de restricción BglI de minicromosomas que recién terminaron de replicarse	74
16	Sensibilidad de complejos nucleoproteicos transcripcionalmente activos, a enzimas de restricción.	78

RESUMEN

En células eucariotas, el DNA se asocia a proteínas histonas constituyendo unidades repetitivas denominadas nucleosomas.

Los nucleosomas se encuentran presentes en aquellas regiones de la cromatina celular activa en replicación o transcripción, por lo que al parecer no son un obstáculo para las maquinarias de síntesis de DNA o RNA. Sin embargo, análisis con DNasa I sugieren que la estructura de la cromatina activa es diferente a la inactiva.

Determinar la estructura específica de la cromatina celular activa, es difícil dada la complejidad de ésta, por lo que se empleó el sistema modelo de SV40 para delucidarla.

El genoma del virus de simio 40, se halla asociado a proteínas histonas de origen celular en una estructura nucleosomal similar a la de la cromatina celular.

Evidencias bioquímicas y de microscopía electrónica, muestran que en periodos tardíos de infección, una fracción (30%) de los minicromosomas, presentan además de sus 24 nucleosomas una región libre de estos denominada "GAP", la cual comprende 400 pb aprox. Esta región es hipersensible a DNasa I y contiene todas

las secuencias reguladoras de la expresión viral como son el origen de replicación, sitios de unión del Ag T, las cajas "TATA" y "CAAT", dos secuencias repetidas de 72 pb y el único sitio de reconocimiento de la enzima de restricción BglI, la cual reconoce específicamente minicromosomas con gap.

En este trabajo, se propuso al gap como la estructura de cromatina encargada de regular los procesos de replicación y/o transcripción.

Mediante marcajes diferenciales, se pudo analizar la sensibilidad a la enzima BglI de minicromosomas inactivos y aquellos activos en replicación, encontrando que ambas poblaciones presentaban un porcentaje similar de moléculas accesibles a la enzima, es decir, solo 30% aproximadamente presentaban la región gap.

Si minicromosomas activos en replicación requieren el gap para realizar este evento, se esperaba encontrar que todos fueran accesibles a la enzima BglI, sin embargo, los resultados mencionados anteriormente, sugieren que esta estructura no es un requisito para que la síntesis de DNA se lleve a cabo.

Por otra parte, empleando un sistema de transcripción in vitro en la presencia de sarkosyl, se pudo analizar la sensibilidad a la enzima BglI de minicromosomas activos en transcripción, encontrando que 95% de ellos son accesibles a la enzima, lo que sugiere que la estructura gap se encuentra en todos ellos.

Estos resultados sugieren que si bien los nucleosomas no son

un impedimento a la maquinaria de transcripción, tal vez se requiere que aquellas secuencias reconocidas por factores de iniciación de la transcripción, no se hallen asociados a proteínas del tipo histonas.

Ya que SV40 fue empleado como modelo de la cromatina celular, estos resultados podrían sugerir la presencia de una estructura similar al gap en regiones celulares activas en ---- transcripción.

INTRODUCCION

El DNA es la macromolécula central de la información en los sistemas biológicos. La información contenida en éste, esta codificada en secuencias de nucleótidos que tienen la capacidad de dirigir una variedad de reacciones biológicas (1).

En células eucariotas, el DNA se halla asociado con proteínas histonas y no histonas (PNH), así como RNA pequeños en una estructura denominada cromatina.

Las proporciones relativas de los componentes de la cromatina varían con el método de aislamiento así como con el tejido de origen. En promedio, la relación entre las proteínas y el DNA es de 2:1. El contenido de RNA es menor al 10% de la masa del DNA y consiste principalmente de cadenas recién sintetizadas asociadas al templado de DNA (2).

Dentro de los componentes de la cromatina, las histonas son las proteínas mayoritarias; en la actualidad se conocen 5 tipos de estas proteínas denominadas H2A, H2B, H3, H4 y H1 (que en el caso de eritrocitos de aves, reptiles, anfibios y peces, esta reemplazada por H5). Estas proteínas son altamente básicas; H1 y H5 son altamente ricas en lisina, H2A, H2B, moderadamente ricas

en lisina y H3, H4 ricas en arginina (3).

Las histonas junto con el DNA forman la unidad básica de la cromatina. En 1974, Kornberg postuló que la estructura básica de la cromatina está constituida por un octámero de histonas y 200 pb de DNA al que denominó nucleosoma. El octámero de histonas está formado por dos de cada una de las histonas H3, H4 fuertemente unidas y dos dímeros de H2A y H2B (4).

El análisis con nucleasa micrococcal, revela que los nucleosomas están formados por una partícula central (core), la cual contienen el octámero de histonas y solamente 140 pb de DNA y una fracción de DNA eslabón (linker) que une las partículas "core" entre sí; la longitud de estas, varía de 15 a 100 pb dependiendo del tejido de origen (5).

Evidencias existentes, sugieren que el DNA se encuentra envolviendo al octámero de histonas, es decir, que se enrolla por fuera de la partícula dándole dos vueltas (6, 7).

El primer nivel de organización de la cromatina está determinada por su arreglo nucleosomal adquiriendo un grosor de 100 Å que compacta al DNA aproximadamente 6 veces (8). Los niveles superiores de organización de la cromatina, se generan mediante el enrollamiento de la fibra nucleosomal básica.

En la región del DNA eslabón, próxima a la partícula central, se encuentra el sitio de interacción de la histona H1 (9). La histona H1 mantienen el segundo nivel de organización de la cromatina, al permitir el enrollamiento helicoidal de la cadena nucleosómica, compactando el DNA unas 40 veces y originando una

fibra de 25 a 30 nm de grosor (10).

Tanto en nucleos en interfase como en cromosomas en metafase, esta fibra se enrolla formando hazas o dominios, los que a su vez se vuelven a plegar hasta constituir la estructura del cromosoma, en el cual el grado de compactación aproximada para el DNA es de 7000-10000 veces.

El arreglo básico de la cromatina persiste durante todo el ciclo celular; la cromatina mitótica altamente condensada, tiene el mismo contenido en histonas que las fibras interfásicas siendo estas mucho más extendidas. La condensación de los cromosomas, puede estar relacionada, sin embargo, con una modificación cíclica de las histonas las cuales pueden ser fosforiladas, acetiladas y metiladas (11).

En la cromatina existen, además de las histonas una gran variedad de proteínas denominadas no histonas (PNH). En este grupo se encuentran toda la variedad de enzimas involucradas en los procesos de replicación, transcripción, modificación --- post-transcripcional de las histonas y proteínas involucradas en la modulación de la expresión genética y en la organización de la cromatina durante la interfase y la división celular.

El análisis de la fracción de PNH provenientes de células Hela, en un sistema de electroforesis bidimensional, muestra al rededor de 470 proteínas diferentes (12). El 40% del total de las PNH lo comprenden la actina, miosina, tubulina y tropomiosina (13).

Existe otro grupo dentro de las PNH, extraídas de la cro-

matina con NaCl 0.35 M y que tienen pesos moleculares menores de 30,000d. A este grupo se le conoce como proteínas de alta movilidad HMG (14).

Se conocen alrededor de 20 proteínas distintas en este grupo, de las cuales 4 han sido caracterizadas HMG1, HMG2, HMG14 y HMG17. Se sabe que HMG14 y HMG17 tienen afinidad por DNA de cadena sencilla y que se encuentran asociadas a la partícula central de los nucleosomas (15). Así, las proteínas no histonas pueden ser necesarias para el empaquetamiento del DNA en las fibras de 250 Å de diámetro, para mantener la estructura en los cromosomas metafásicos y regular la expresión de ciertos genes.

La expresión de la información contenida en la cromatina es regulada, al menos en parte, por cambios locales en la estructura de la cromatina. Estas alteraciones estructurales, pueden definir la naturaleza de aquellas secuencias que van a ser replicadas o transcritas y modular sus niveles de transcripción.

ESTRUCTURA DE LA CROMATINA ACTIVA EN REPLICACION.

En células eucariotas, la replicación del DNA, esta confinada a a la fase S del ciclo celular.

Para replicar la gran cantidad de DNA celular, este se organiza en unidades de replicación denominadas replicones; en estos, la replicación se origina en un punto específico y continúa de manera bidireccional y semiconservativa, es decir, una de las cadenas es sintetizada de manera continua (la que tiene

la orientación 5'-3'), mientras que la otra (con orientación 3'-5') se sintetiza de manera discontinua a través de los denominados fragmentos de Okazaki (16).

El evento de replicación es controlado a nivel de la iniciación. Se ha sugerido que la frecuencia de iniciación está controlada por la interacción de proteínas reguladoras con el origen de replicación (17), como ha sido demostrado para algunos virus (18). Sin embargo, parece que este no es el único factor regulador, ya que se ha observado que la eucromatina (formada por cromatina transcripcionalmente activa) es replicada antes que la heterocromatina (cromatina permanentemente condensada durante la interfase), lo que sugiere que la estructura de la cromatina juega un papel regulador en la iniciación de la replicación (17).

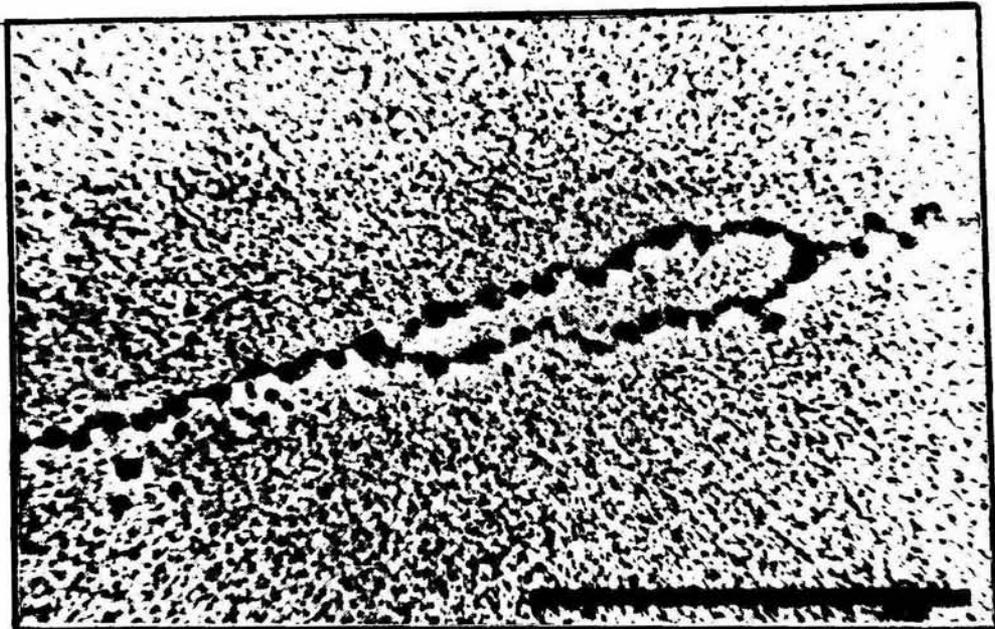
La replicación del DNA está acoplada a la síntesis de histonas durante la fase S, lo que permite que durante la replicación la relación proteína-DNA se conserve de manera consante.

Varios grupos han analizado la estructura de la cromatina en replicación por medio del microscopio electrónico y han observado que partículas globulares similares a nucleosomas se hallan en ambos brazos del tenedor de replicación. Su tamaño y periodicidad son similares al de la cromatina que no se halla replicando (19). (ver Figura 1).

En el caso de SV40, es incluso posible distinguir que el nivel de compactación del DNA en replicación, es básicamente el mismo que para el DNA que no está replicando (20). Además, análisis en geles de poliacrilamida del contenido de proteínas del DNA en

FIGURA 1. Microfotografía electrónica de cromatina activa en replicación.

La cromatina celular activa en replicación, presenta, la estructura típica de cromatina, es decir, se nota la presencia de nucleosomas incluso sobre ambos brazos del tenedor de replicación. (Tomada de 20)



replicación, muestra que las 4 histonas H3, H4, H2A y H2B están presentes. Estudios de inmunomicroscopía de la cromatina de embriones de *Drosophila* usando anticuerpos dirigidos contra H3 y H2B, han demostrado la presencia de estas dos histonas sobre las dos cromátidas hijas (19).

Todas estas evidencias relacionadas con la microscopía electrónica, sugieren que las partículas globulares presentes en los dos brazos del tenedor de replicación son nucleosomas, los cuales son similares a los que se encuentran en la cromatina inactiva en replicación. Además, estos resultados sugieren que las histonas permanecen asociadas al DNA durante la replicación o que si estas se disocian pueden ser reasociadas inmediatamente (16).

Aún cuando estos estudios muestran la asociación de nucleosomas a la cromatina en replicación, no excluyen que exista una ligera modificación de la estructura nucleosomal durante este evento. Esto ha sido demostrado por trabajos basados en la sensibilidad a diferentes nucleasas de la cromatina en replicación.

Se ha observado, por ejemplo, que cromatina celular en replicación como aquella de origen viral, son más rápida y extensivamente degradadas por DNasa I que la cromatina que no se está replicando (21). Existen evidencias también, de que esta sensibilidad se limita a la regiones más próximas al sitio donde se está llevando la síntesis de DNA. Esta sensibilidad es perdida una vez que el tenedor de replicación ha pasado, adquiriendo una sensibilidad similar a la de la cromatina inactiva (22).

Todos estos resultados sugieren que si bien los nucleosomas no son un impedimento para que la replicación se efectúe, tal vez se requiera de una estructura nucleosomal característica alrededor de sitios clave para que la replicación se lleve a cabo, como podría ser al rededor del origen de replicación.

En apoyo a esta sugerencia, existen evidencias que muestran una región desprovista de nucleosomas alrededor del origen de replicación en minicromosomas de SV40 y Polyoma (23, 24) aunque no ha sido determinado si esta juega un papel durante la replicación.

ESTRUCTURA DE LA CROMATINA ACTIVA EN TRANSCRIPCIÓN.

Se ha puesto en evidencia que genes activamente transcritos en un tipo celular determinado, presentan una estructura repetitiva en subunidades de nucleoproteína características de la totalidad de la cromatina (25). Estas observaciones sugieren que el DNA que se transcribe activamente, se encuentra asociado a proteínas histonas, aunque no queda claro si esta asociación forma estructuras tipo nucleosoma. Una evidencia directa que sugiere fuertemente la presencia de nucleosomas en genes transcripcionalmente activos, se obtuvo con el complejo de transcripción del virus de simio 40 (26). Estas observaciones muestran que la compactación del DNA en nucleosomas de genes específicos, no es suficiente para inhibir su transcripción (ver Figura 2).

FIGURA 2. Microfotografía electrónica de minicriposoma de SV40 activo en transcripción.

En esta, se observa claramente la cadena de RNA en síntesis, asociada al templado, y la presencia de nucleosomas a lo largo del genoma viral adquiriendo la estructura característica de la cromatina. (Tomada de 26)



Weintraub y Groudin en 1976 (25), demostraron en cromatina de células de ave, que genes que se transcriben son particularmente sensibles a la acción de la DNasa I, mientras que estos mismos genes son resistentes en células donde no se expresan. Estos mismos autores, han sugerido que si bien pueden existir nucleosomas en genes activos en transcripción, estos se pueden encontrar en una configuración estructural alterada de tal manera que faciliten el acceso a la DNasa I.

En varios sistemas de cromatina que contienen genes activos en transcripción tales como el gen de ovalbúmina en células de oviducto de gallina (28), en células de *Drosophila* después de la inducción de la transcripción por calor (heat-shock) en loci inducible (29) y en varios genomas virales integrados al genoma huésped, transcripcionalmente activos (30), se ha detectado hipersensibilidad a la DNasa I, la cuál, además es independiente del nivel de síntesis de RNA.

Actualmente se ha mapeado la posición de los sitios hipersensibles al ataque nucleolítico en la cromatina activa y se ha encontrado que cae en el extremo 5' de los genes analizados (31).

La hipersensibilidad de la cromatina transcripcionalmente activa a la DNasa I, se ha relacionado con diversos factores: con la presencia de proteínas del tipo HMG (32), con la ausencia de histona H1 en cromatina activa (33), con la presencia de especies acetiladas de histonas (34), así como con la ausencia de nucleosomas en esta región específica del gen, como ha sido reportado recientemente en SV40 (23, 24). Sin embargo, el significado fun-

cional de la hipersensibilidad a la DNasa no es claro.

La construcción in vitro de mutantes deletados en el extremo 5' así como la generación de mutaciones puntuales in vitro a partir de distintos genes eucariotes, ha permitido establecer la existencia de secuencias compartidas entre los genes estudiados alrededor de su extremo 5', las cuales son consideradas como secuencias promotoras de reconocimiento para la maquinaria enzimática de transcripción e indispensables para la síntesis precisa de las moléculas de RNAm.

Dentro de estas secuencias se encuentran: la caja "TATA" (5'-TATATAT-3') ubicada a -32 pb del sitio de iniciación de la cadena de RNA, que es indispensable para la iniciación específica de la transcripción in vitro dependiente de la RNA polimerasa II (35); la caja CAAT (5'-GGTCAATCT-3'), que se encuentra entre -70 y -50 pb del sitio de iniciación de la transcripción y que posiblemente este relacionada con la activación de la RNA polimerasa (36) y por último, un tercer tipo de secuencias que intervienen en la actividad transcripcional y que se conocen como aumentadoras o "enhancer". Estas secuencias son capaces de potenciar la transcripción varios órdenes de magnitud independientemente de la posición y/u orientación (37).

El hecho de que el extremo 5' de un gen determinado activo en transcripción sea hipersensible a la acción de la DNasa I y que en esta región se encuentren todas las secuencias necesarias para la regulación del mismo, sugiere que si bien los nucleosomas no son un impedimento para que la transcripción se lleve a cabo, es

necesario que al menos la región reguladora del gen esté libre de ellos para iniciar la síntesis de RNA (38).

Tratar de determinar la estructura particular en la cromatina que confiere a una región la potencialidad de replicarse y/o transcribirse, representa un gran problema si se analiza la cromatina celular ya que es demasiado compleja, por lo que se ha recurrido al empleo de sistemas modelo como son los virus que pueden facilitar en gran medida dicho análisis.

VIRUS DE SIMIO 40.

El virus de simio 40 (SV40) ofrece un sistema modelo de cromatina celular ya que es un virus relativamente simple y emplea la maquinaria celular para la expresión de su genoma a nivel replicación como transcripción.

Este virus fue encontrado en 1960 (39), como contaminante de vacunas contra la poliomielitis producidas en células de riñón de mono. Posteriormente a su descubrimiento, se mostró que este virus es capaz de producir tumores cuando se inyecta en Hamsters recién nacidos (40).

SV40 pertenece a la familia de los papovavirus y se encuentra entre los más pequeños. Originalmente se le conoció como agente vacuolizante debido a su capacidad para producir múltiples vacuolas en el citoplasma de células de riñón de mono verde africano.

Los viriones son casi esféricos y se encuentran formados por

DNA y proteína. El diámetro de cada virión es de 45nm. La cápside es icosaédrica y se encuentra formada por 72 capsómeros. Los componentes protéicos estructurales del virus los constituyen las denominadas Vp1, Vp2 y Vp3. Los pesos moleculares de estas proteínas son Vp1- 45 Kd, Vp2-42 Kd y Vp3-30 Kd (40).

Cada virión presenta una molécula de DNA circular de doble cadena, con un peso molecular de 3.6×10^6 dalton constituido por 5243 pb. El tamaño pequeño del genoma de SV40 permitió la construcción de un mapa físico detallado (ver Figura 3) y el conocimiento de la secuencia completa del DNA (41).

Durante la infección en células permisivas, el DNA de SV40 se halla en una estructura similar a la de la cromatina celular, es decir, se encuentra asociado a histonas de origen celular formando nucleosomas, por lo que se le considera un minicromosoma (42). Observaciones al microscopio electrónico de minicromosomas, muestran que el genoma viral se empaqueta en 24 nucleosomas.

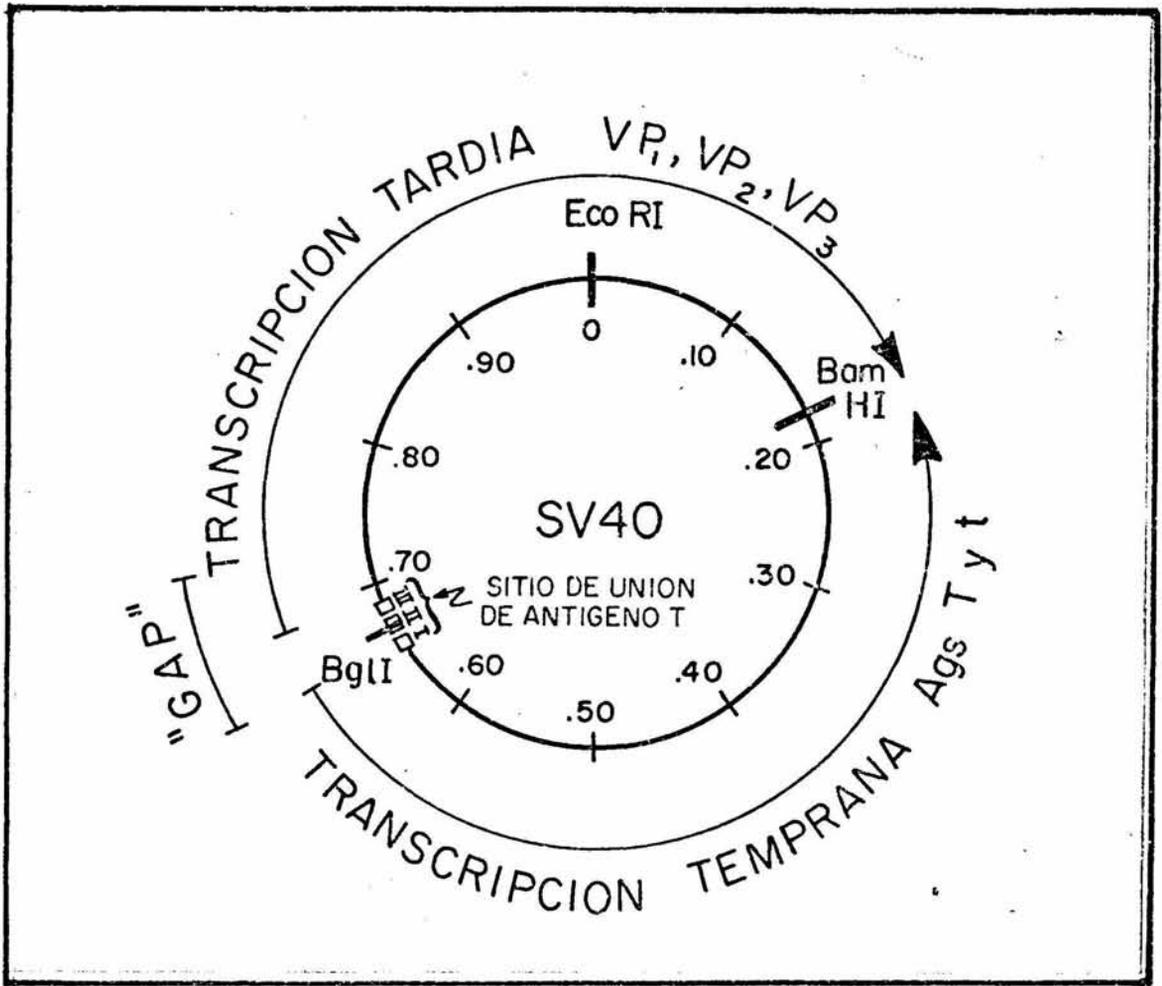
Además de las histonas, como ya se mencionó, SV40 utiliza la maquinaria celular para la expresión de su material genético y para su replicación.

El DNA del virus, puede ser dividido en términos biológicos en dos regiones, la temprana y la tardía que se expresan secuencialmente durante el ciclo lítico de infección en células permisivas. La región temprana que se expresa al inicio de la infección codifica dos genes que son transcritos a RNAm en ausencia de cualquier proteína viral funcional. Los productos de estos genes son el antígeno T grande (Ag T) de 90 Kd y el antígeno t

FIGURA 3. Mapa físico de SV40. Se muestra la región que se transcribe tempranamente y que da origen a los Ags T y t, y la región que se transcribe Tardíamente cuyos productos son Vp1, Vp2 y Vp3.

Los sitios de unión del Ag T son indicados, así como los de reconocimiento por las enzimas de restricción BglI (que reconoce moléculas con gap), Bam HI y Eco RI, empleadas en este trabajo.

La región donde se forma el GAP es señalada.



pequeño (Ag t) de 20 Kd. El antígeno T es la única proteína viral necesaria para la replicación del DNA viral (43). La función del antígeno t no ha sido bien definida.

El momento en el cual la síntesis de DNA viral empieza, define el final de la fase temprana y el inicio de la fase tardía durante la cual se expresa la región tardía del DNA que tiene como resultado la síntesis de RNAm para las proteínas de la cápside Vp1, Vp2 y Vp3 (40).

REPLICACIÓN VIRAL.

La replicación del virus procede por un mecanismo semiconservativo y bidireccional dando lugar a intermediarios replicativos con estructura Cairns (40). El origen de replicación ha sido mapeado en una región de 60-65 pb centrándose en el único sitio de reconocimiento de la enzima BglI, este sitio está auxiliado por 2 secuencias de 21 pb repetidas que también juegan un papel importante durante la transcripción (44) (ver Figura 5).

La iniciación de cada vuelta de replicación del DNA viral requiere de concentraciones adecuadas de Ag T como ha sido demostrado por el uso de mutantes TsA (45). Tetrámeros de Ag T reconocen y se unen cooperativamente a una familia de secuencias que definen tres regiones. La región I, cae dentro del lado temprano del origen, la región II dentro del origen de replicación y la región III se halla en la región tardía del DNA viral (46).

Además de las secuencias de origen y del Ag T, el virus

requiere para su replicación de proteínas específicas de la célula huésped. La α -DNA polimerasa es la encargada de la síntesis del DNA de SV40 junto con proteínas desestabilizadoras de hélice, topoisomerasas, primasas y ligasas (47).

El porcentaje de moléculas activas en replicación solo representa el 5% de la totalidad de minicromosomas (48).

A medida que se efectúa la replicación, se lleva a cabo el desenrollamiento del DNA de los nucleosomas que se encuentran frente al tenedor de replicación y el enrollamiento del nuevo DNA una vez que el tenedor de replicación ha pasado (49). Dado que la replicación es semidiscontinua, las evidencias sugieren que los octámeros de histonas "viejas" se asocian con el brazo que se sintetiza de manera continua, mientras que los octámeros recién sintetizados se asocian al brazo que se sintetiza en fragmentos de Okazaki (50).

TRANSCRIPCIÓN DE SV40.

La síntesis de los transcritos de SV40 se lleva a cabo por la acción de la RNA polimerasa II de la célula huésped (51) y probablemente por factores celulares necesarios para la iniciación.

Hay dos tipos de RNAm tempranos que codifican el Ag T grande y el Ag t pequeño, respectivamente. Ambas clases de mensajeros, usan el mismo conjunto de secuencias 5'-3' terminales y son transcritos de la misma región promotora (52).

El extremo 5' de los RNAm virales mapean en sitios cercanos al origen de replicación. Aproximadamente de 25 a 30 nucleótidos del inicio se encuentra una secuencia que asemeja la caja "TATA" encontrada en el extremo 5' de la mayoría de los genes eucariotes como ya se mencionó (52). Si se elimina la caja "TATA", no hay un bloqueo de la transcripción in vivo o in vitro, pero el sitio de iniciación se distribuye a través de una amplia región de DNA (35). Las secuencias estrictamente necesarias para la transcripción in vivo, se encuentran por arriba de la caja TATA. Estas secuencias las constituyen dos copias de 21 pb que asemejan la caja CAAT y dos copias de 72 pb (53).

La eliminación de una de las copias de 72 pb da lugar a mutantes viables de SV40, pero si se eliminan ambas copias los mutantes no son viables y el daño causado a la región temprana es sumamente drástico. Este daño puede ser rectificado si se reinserta una secuencia de 72 pb ya sea en el mismo lugar o incluso a una distancia de 4000 pb de la región que se expresa tempranamente independientemente de la orientación. Las secuencias repetidas de 72 pb son también capaces de estimular la expresión de genes diferentes a los de SV40, por lo que se les ha considerado como aumentadoras de la transcripción o enhancer (54).

Normalmente la expresión de los RNAm tempranos es retroregulada por uno de los productos sintetizados durante su expresión, el Ag T, el que al unirse a las regiones I, II y III ya descritas, bloquea el paso de la RNA polimerasa hacia la región temprana obligándola a recorrer la región tardía (55).

Como se mencionó anteriormente, el momento en el cual empieza la síntesis del DNA viral define el final de la fase temprana y el inicio de la fase tardía, durante la cual se sintetizan los mensajeros que darán lugar a las proteínas de la cápside viral Vp1, Vp2 y Vp3.

El porcentaje de moléculas activas en transcripción en este periodo representa solo el 1% (56).

El inicio de la producción de los mensajeros tardíos y su regulación parece más complejo que el de los RNA tempranos. Los RNAm transcritos tardíamente in vivo, presentan extremos 5' heterogéneos (52). El principal extremo 5' se encuentra en el residuo 243 aunque son múltiples los sitios de iniciación.

En la actualidad no se ha reconocido una caja TATA a -30 pb del sitio principal de iniciación de la transcripción, aunque mutantes con deleciones viables pueden carecer de 70 pb por arriba o por abajo del sitio principal de iniciación, pero el sitio de iniciación se desplaza lo que sugiere que secuencias por arriba o por abajo del sitio principal de iniciación pueden definir el extremo 5' de los transcritos tardíos (57).

"GAP".

Estudios realizados por Waldeck, W. (58) destinados a detectar factores involucrados en la replicación a partir de extractos celulares y empleando a SV40 como modelo de replicación, demostraron la presencia de una endonucleasa propia de la célula

que en ocasiones era purificada con los minicromosomas de SV40. Si un extracto celular conteniendo esta endonucleasa era incubado con minicromosomas de SV40, solamente 30% de ellos eran reconocidos por la enzima. Se mapeo el sitio susceptible a la enzima y se encontró que todos los minicromosomas reconocidos por la enzima eran cortados cerca del origen de replicación, lo que sugería la existencia de una estructura característica en los minicromosomas que presentaban accesibilidad a la enzima.

En ese mismo año, Scott A. y Wigmore J. (23) publicaron un trabajo en el cual analizaban la susceptibilidad de minicromosomas de SV40 para las enzimas DNasa I y Nucleasa estafilococal, encontrando que estos eran accesibles a las enzimas en una región comprendida entre 0.67 y 0.73 UM del genoma viral (Ver Figura 3), dentro de la cual se encuentra el origen de replicación n.

Trabajos posteriores realizados por Varshasky y col. (59) empleando enzimas de restricción que reconocen sitios múltiples en el genoma de SV40, mostraron resultados que corroboraban los ya descritos.

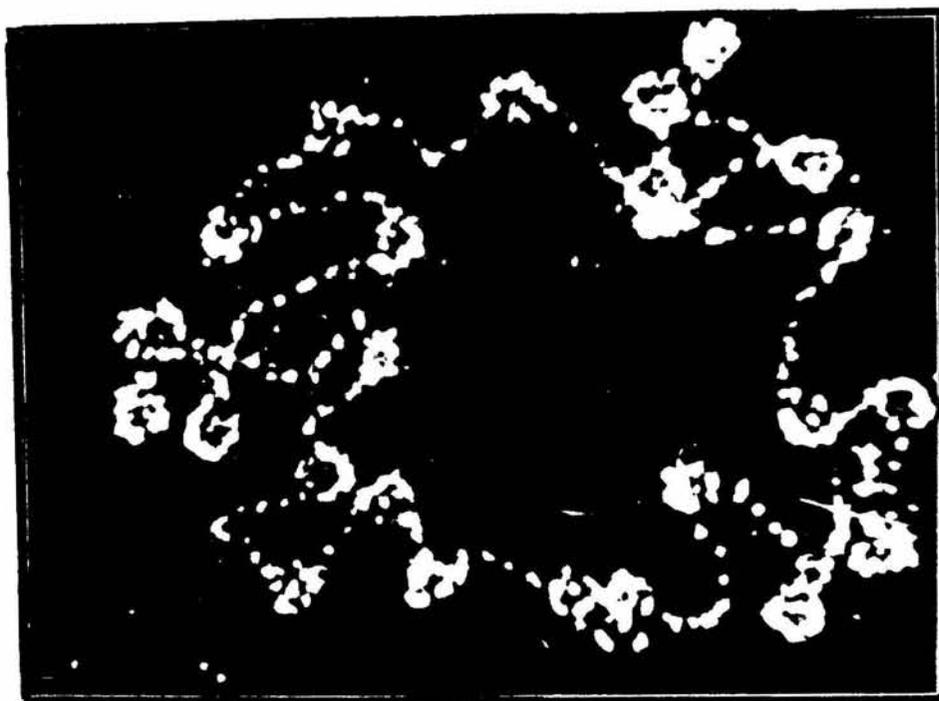
Fue en 1980, cuando Saragosti S., Moyne G. y Yaniv, M. (24) empleando el microscopio electrónico para analizar minicromosomas de SV40 purificados 40 horas después de la infección, encontraron que aproximadamente 30% de los minicromosomas presentaban además de sus 24 nucleosomas, una región desprovista de éstos, de casi 400 pb y que mapeaba en el origen de replicación de acuerdo con los resultados bioquímicos previamente citados (ver Figura 4). Esta

FIGURA 4. Microfotografía electrónica en campo oscuro de -
minicromosomas de SV40.

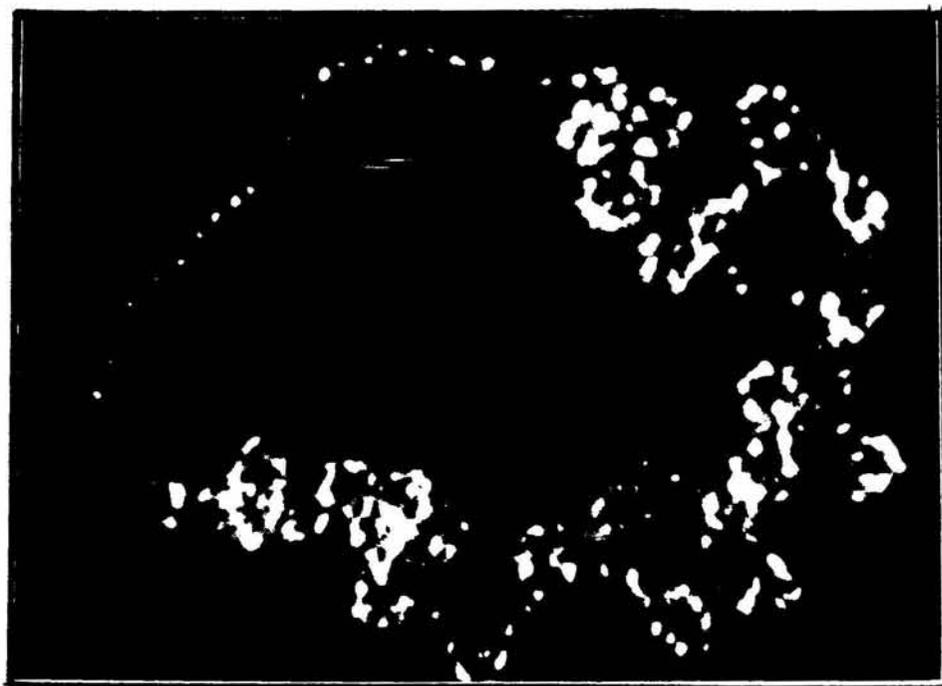
En A se muestran un minicromosoma de SV40 que no presenta
la región desprovista de nucleosomas (GAP).

En B se muestra un minicromosoma presentando la región
GAP.

El número de nucleosomas en ambas moléculas es el mismo.
(tomada de 26).



A



B

región fue denominada "GAP".

Estos mismos autores, mostraron que la región gap se encontraba in situ y que no era un artefacto provocado durante la extracción.

Analizando las secuencias comprendidas dentro de la región gap, se encontraron las dos repetidas de 72 pb, los dos juegos de 21 pb, la caja TATA, dos de los tres sitios de reconocimiento del Ag T, parte de las secuencias del origen de replicación y el único sitio de reconocimiento de la enzima BglI (5'-----GCCNNNNNGGC-3'), que en conjunto son las secuencias encargadas de regular la transcripción y la replicación como se mencionó anteriormente, además de ser las encargadas directas de la formación del gap como ha sido sugerido recientemente (60, 61) (ver Figura 5).

Estudios realizados por Saragosti, S, y col. (62), muestran que esta región presenta in situ hipersensibilidad a DNasa I como los extremos 5' de genes celulares activos en transcripción.

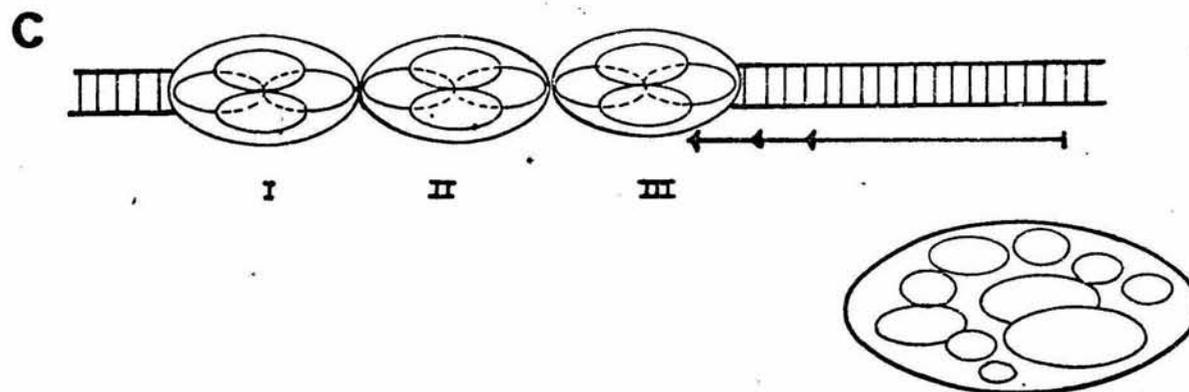
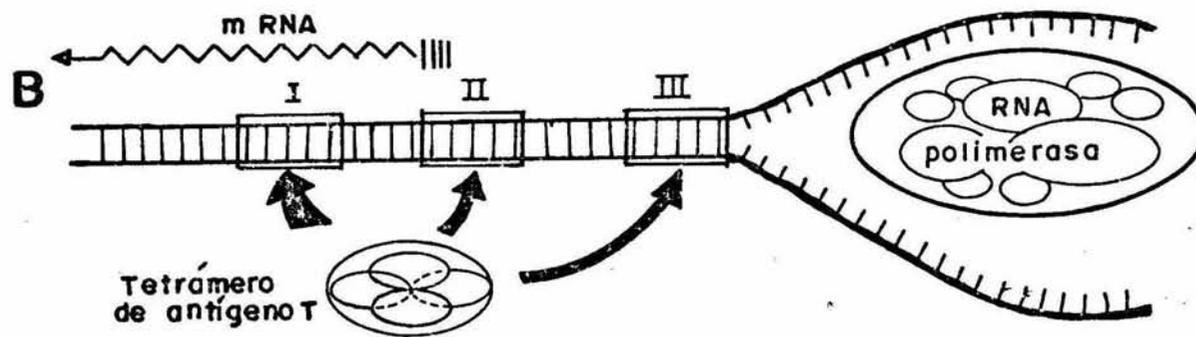
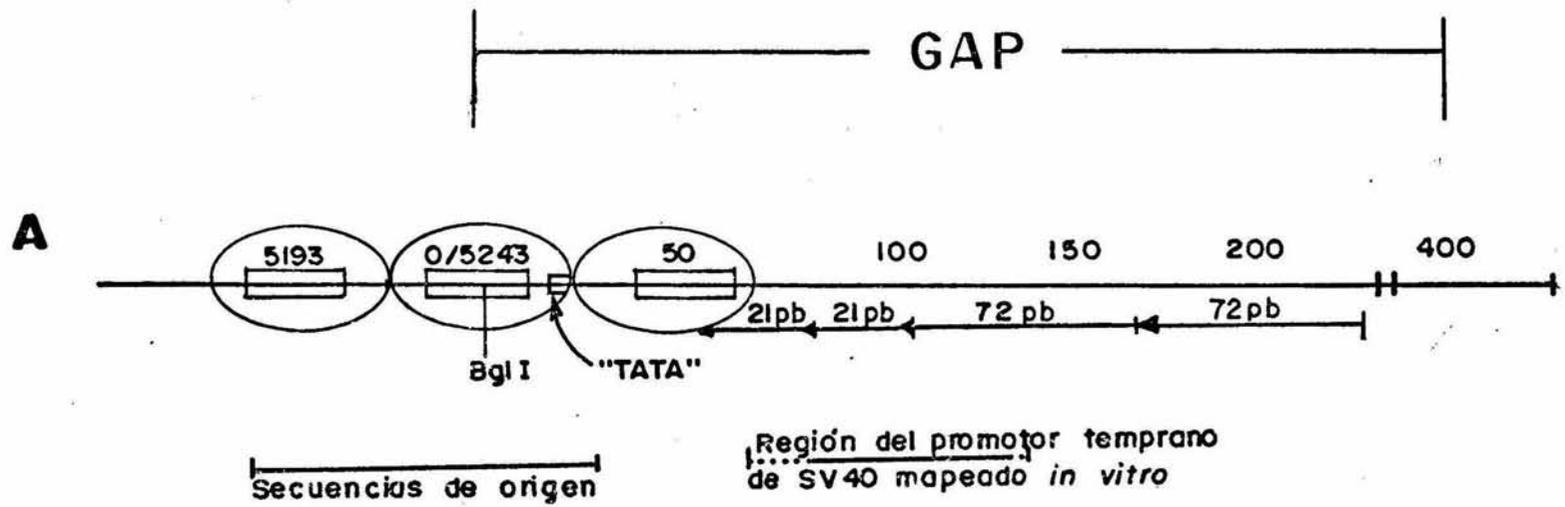
En resumen, todas estas evidencias sugieren la existencia de una región desprovista de nucleosomas que comprende todas las secuencias reguladoras para la expresión viral, la cual en consecuencia pudiera ser considerada como una característica estructural en la cromatina viral para que los procesos de replicación y transcripción se lleven a cabo, dada la implicación que la estructura tiene en la activación genética, como ha sido mencionado de antemano.

FIGURA 5. Secuencias comprendidas dentro de la región GAP.

A) Se muestra la localización de las secuencias reguladoras de la transcripción viral como son las repetidas de 21 pb que asemejan la caja CAAT; las repetidas de 72 pb con actividad aumentadora de la transcripción y la caja TATA que da -- especificidad a la iniciación. Todas ellas localizadas dentro del GAP.

Dentro de esta región, se localizan también parte de las secuencias reguladoras de la replicación, como son el origen de replicación y dos de los tres sitios de unión del Ag T.

B) y C), muestran el bloqueo a la RNA polimerasa producido por la unión del Ag T a sus 3 sitio de reconocimiento sobre el genoma viral.



OBJETIVO.

Datos aportados a través de análisis con DNasa I de la cromatina celular, sugieren que la estructura juega un papel importante en la regulación de la expresión genética a nivel replicación y transcripción.

El hecho de encontrar en 30% de minicromosomas de SV40 una región desprovista de nucleosomas en la que se hallan las secuencias reguladoras de la expresión viral, sugieren la posibilidad que esta estructura sea la encargada de regular la replicación y/o transcripción.

Determinar la presencia del gap en minicromosomas activos, en replicación o transcripción es el objetivo de este trabajo, lo que haría posible sugerir que una estructura similar se encuentra dentro de la cromatina celular para regular la replicación y/o transcripción en regiones específicas.

MATERIALES Y METODOS.

CULTIVO DE CELULAS CV1. La línea celular establecida a partir de células de riñón de mono, se cultivó en monocapa en medio Eagle modificado por Dulbecco (63), suplementado con suero fetal de ternera al 10%. Las células se mantuvieron en incubación a 37°C y en atmósfera de CO₂ al 6%.

Para los pasajes de mantenimiento, las células fueron sembradas a una densidad de 5X10⁶ células en 20 ml de medio con suero, en frascos de 75 cm³.

PROPAGACION DEL VIRUS SV40. Para infectar con el virus SV40 (cepa 777), las células fueron sembradas en cajas de 35 cm³ a una densidad de 3X10⁶ células por caja con 10 ml de medio suplementado con suero al 10%. 72 horas después, las monocapas se lavaron dos veces con solución PBS (tampón fosfatos 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM) y se infectaron con el virus SV40 a una multiplicidad de infección de 1X10⁻⁴ UFP/célula, en un volumen de 0.5 ml de medio Eagle modificado por Dulbecco sin suero. Se permitió la adsorción del virus por 90 minutos a 37°C y posteriormente se adicionó a cada caja 10 ml de medio suplementado con 2% de suero fetal de ternera. Las células infectadas fueron mantenidas en incuba-

ción a 37°C durante 12 días, tiempo en el cual se pudo observar el efecto citopático.

El contenido de las cajas fue vertido a una botella estéril después de raspar el fondo de las cajas con un fragmento de hule; posteriormente se centrifugó el contenido a 8,000 rpm por 30 minutos en un rotor GSA Sorvall a 4°C. El sobrenadante se guardó y la pastilla obtenida se resuspendió con el mínimo volumen de PBS, se le dieron tres ciclos de congelación-descongelación en una mezcla de etanol-hielo seco. La pastilla resuspendida se volvió a centrifugar bajo las condiciones anteriores. Se juntaron los sobrenadantes obtenidos en ambas centrifugaciones y se centrifugaron nuevamente a 25,000 rpm durante 4.5 horas a 4°C en un rotor Beckman SW28. El sobrenadante se descartó y la pastilla que contenía el virus fue resuspendida por 16 horas en medio con suero al 1%. Se tomaron alícuotas de 1 ml para almacenarlas a -20°C. La concentración del virus en la suspensión se determinó cuantificando el ADN por el método de Hirt (75).

EXTRACCION DE DNA POR EL METODO DE HIRT. Células CV1 fueron infectadas y marcadas según requerimiento del experimento con ³H-Timidina o ¹⁴C-Timidina como se describe más adelante. 40 horas después de la infección, las monocapas se lavaron 2 veces con 2.5 ml de PBS y se añadió a cada caja 2.5 ml de solución de Hirt (Tris-HCl 10 mM pH 7.9, EDTA 10 mM y SDS 0.6%), se mantuvieron 20 minutos a temperatura ambiente, tiempo en que se forma un gel que fue cuidadosamente raspado con una concentración final de 1 M. Los tubos se mantuvieron a 4°C por 16 horas y se centrifugaron a

8,000 rpm por 1 hora en el rotor SS34 Sorvall a 4°C a fin de precipitar el DNA celular. Se recuperó el sobrenadante y se utilizó para cuantificar DNA por el método de Burton o bien, para extraer DNA con fenol.

CUANTIFICACION DE DNA POR EL METODO DE BURTON (64). Se preparó una solución de DNA de timo de ternera de 0.4 mg/ml en 5 mM NaOH.

De esta solución se prepararon las utilizadas para construir una curva patrón. Se mezcló un volumen igual de solución stock con HClO₄ 1 N y se calentó a 70°C por 15 minutos. Estas soluciones se prepararon a una concentración de 10, 20, 30 y 40 ug/ml y para el ensayo, estas correspondieron a 2, 4, 6 y 8 ug/ml respectivamente.

El reactivo de difenilamina se preparó disolviendo 1.5 g de difenilamina en 100 ml de ácido acético y se adicionó 1.5 ml de ácido sulfúrico (se almacenó en oscuridad).

En el momento de usarse, se tomó 0.1 ml de acetaldehído acuoso (16 mg/ml) y se adicionó por cada 20 ml de solución de difenilamina.

Para el ensayo se tomaron 200 ul de la muestra, se le adicionó 200 ul de HClO₄ 0.5 N y 800 ul del reactivo de difenilamina-acetaldehído.

Los tubos conteniendo la muestra se mantuvieron en la oscuridad y en agitación suave por un periodo de 24 horas a temperatura ambiente. Se determinó la absorvancia a 600 nm en un espectrofotómetro Zeiss. De la cantidad de DNA determinada por este método y de las cuentas por minuto totales, se determinó la actividad específica (cpm/ug DNA).

PURIFICACION DE DNA DE SV40. Un volumen de DNA se mezcló con un volumen igual de fenol saturado en Tris-HCl .2 M pH 7.4. Se centrifugó a 8,000 rpm por 10 minutos en un rotor Sorvall SS34; se tomó la fase acuosa (superior) y se separó en un tubo.

A la fase inferior se le adicionó medio volumen de amortiguador Tris-HCl 10 mM pH 7.4, EDTA 1 mM (TE). Se centrifugó bajo las condiciones descritas y se volvió a tomar la fase superior que se mezcló con la obtenida anteriormente. A la mezcla se adicionó un volumen igual de cloroformo-alcohol isoamílico (25:1). Se dejó reposar por 5 minutos después de mezclar. Posteriormente, se tomó la fase acuosa, en la que se encuentra el DNA y se le adicionó 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío, dejando a 4°C toda la noche. Posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm por 60 minutos en un rotor SS34. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla de DNA se secó y resuspendió en el volumen mínimo de amortiguador TE.

EXTRACCION DE COMPLEJOS NUCLEOPROTEICOS DE SV40. A) Infección: Se llevó a cabo como se describió anteriormente solo que se emplearon de 10 a 50 UFP/célula. Después de 90 minutos de adsorción del virus, se añadió medio suplementado con suero al 2% y se consideró entonces el tiempo cero de infección.

B) Marcaje de células CV1: Se emplearon tres tipos

Marcaje largo: Entre 24 y 40 horas de infección, las células fueron marcadas con 2.5 μ Ci/caja de 14 C-Timidina (56mCi/mmol) o bien con 25-50 μ Ci/caja (46 Ci/mmol) de 3 H-Timidina.

Pulso: 40 horas después de la infección, las células se

marcaron por un pulso de 5 minutos con ^3H -Timidina. Para dar el pulso, las células se lavaron dos veces con 2.5 ml de medio precalentado con suero al 2% y entonces se adicionó a cada caja 2 ml de medio suplementado con suero al 2% y 100 $\mu\text{Ci/ml}$ de ^3H -timidina y se incubaron por 5 minutos a 37°C . El marcaje se paró colocando las cajas en hielo, retirando rápidamente el medio y adicionando 2.5 ml de amortiguador Tris-HCl 1 mM pH 6.8, NaCl 140 mM (amortiguador 1).

Pulso-Caza: 40 horas después de la infección, las células se marcaron por un pulso de 5 minutos con ^3H -Timidina como se describió anteriormente, se eliminó el medio y se lavaron dos veces con 5 ml de medio precalentado suplementado con 2% suero, 100 $\mu\text{g/ml}$ de timidina y 10 $\mu\text{g/ml}$ de deoxicitidina. Se adicionó a cada caja 10 ml de medio y se incubaron a 37°C por un periodo adicional de 10, 30 y 45 minutos. Al finalizar el periodo de caza, las cajas con las células se colocaron en hielo, se retiró el medio y las monocapas se lavaron dos veces con amortiguador 1.

Se procedió inmediatamente a la extracción de complejos nucleoprotéicos.

El método empleado para la extracción de los minicromosomas fue el descrito por Varshavsky, A. (65), que emplea 0.14 M NaCl.

Las cajas con las células se lavaron dos veces con 2.5 ml de amortiguador 1. A cada caja se adicionó 2 ml del amortiguador TEA-HCl 10 mM pH 6.8, Tritón x-100 0.25%, EDTA-Na 10 mM, PMSF 1mM, y se mantuvieron 10 minutos a 4°C . Posteriormente se adicionó NaCl a una concentración final de 120 mM. El lisado obte-

FIGURA 6. Esquema general para la detección de sensibilidad a enzimas de restricción en minicromosomas de SV40 activos en Replicación.

PULSO 5 MINUTOS

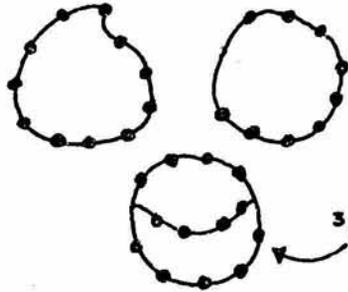


40 HRS

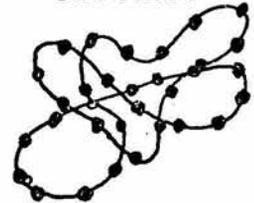


NUCLEOS

CROMATINA VIRAL



CROMATINA CELULAR



DIGESTION CON ENZIMAS DE RESTRICION

ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

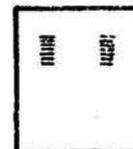
MINICROMOSOMAS MADUROS DE SV 40
95%

MOLECULAS ACTIVAS EN REPLICACION.
5%



TINCION BROMURO

LR
FORMA II
FORMA III
FORMA I



AUTORADIOGRAFIA

nido se raspó de las cajas con un fragmento de hule y se centrifugó a 6,500 rpm durante 5 minutos a 4°C en el rotor Sorvall SS34. La pastilla nuclear obtenida de $5-8 \times 10^6$ células, fue resuspendida en 20 ml del amortiguador TEA-HCl 10 mM pH 6.8, Tritón X-100 0.25%, NaCl 120 mM, EDTA 10 mM, PMSF 0.1 mM; se centrifugó en las condiciones descritas. La pastilla de núcleos se resuspendió, para la extracción de complejos nucleoprotéicos, en 1 ml del amortiguador TEA-HCl 10 mM pH 8.0, Tritón X-100, NaCl 120 mM, EDTA 10 mM, PMSF 0.1 mM y se incubó en eagitación a 4°C por 3 horas. Posteriormente se centrifugó 15 minutos bajo condiciones ya mencionadas y el sobrenadante se colocó sobre un gradiente lineal de sacarosa de 5-25% con colchón de 40% en amortiguador TEA-HCl 10 mM pH 7.5, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM. Toda la extracción se efectuó a 4°C. Las muestras se centrifugaron en el rotor SW50.1 a 45,000 rpm por 53 minutos a 4°C.

Después de la centrifugación se colectaron 20 fracciones de 250 μ l. Se tomaron alícuotas de cada fracción y se colocaron sobre papel Whatman 3 MM. La muestra fue precipitada de 3 a 5 veces por periodos de 5 minutos a 4°C con TCA al 5% y lavados dos veces con etanol al 95%. Los papeles se secaron y colocaron en viales que contenían 5 ml de una solución de PPO 1.25% y POPOP 0.04% en tolueno. Los viales se contaron un minuto en el contador de centelleo líquido modelo C2425 Packard, bajo condiciones automáticas de ^3H , ^{14}C ; $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ ó $^{32}\text{P}/^3\text{H}$.

DIGESTION DE COMPLEJOS CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN. La digestión se realizó directamente en una alícuota del gradiente preparativo

de sacarosa.

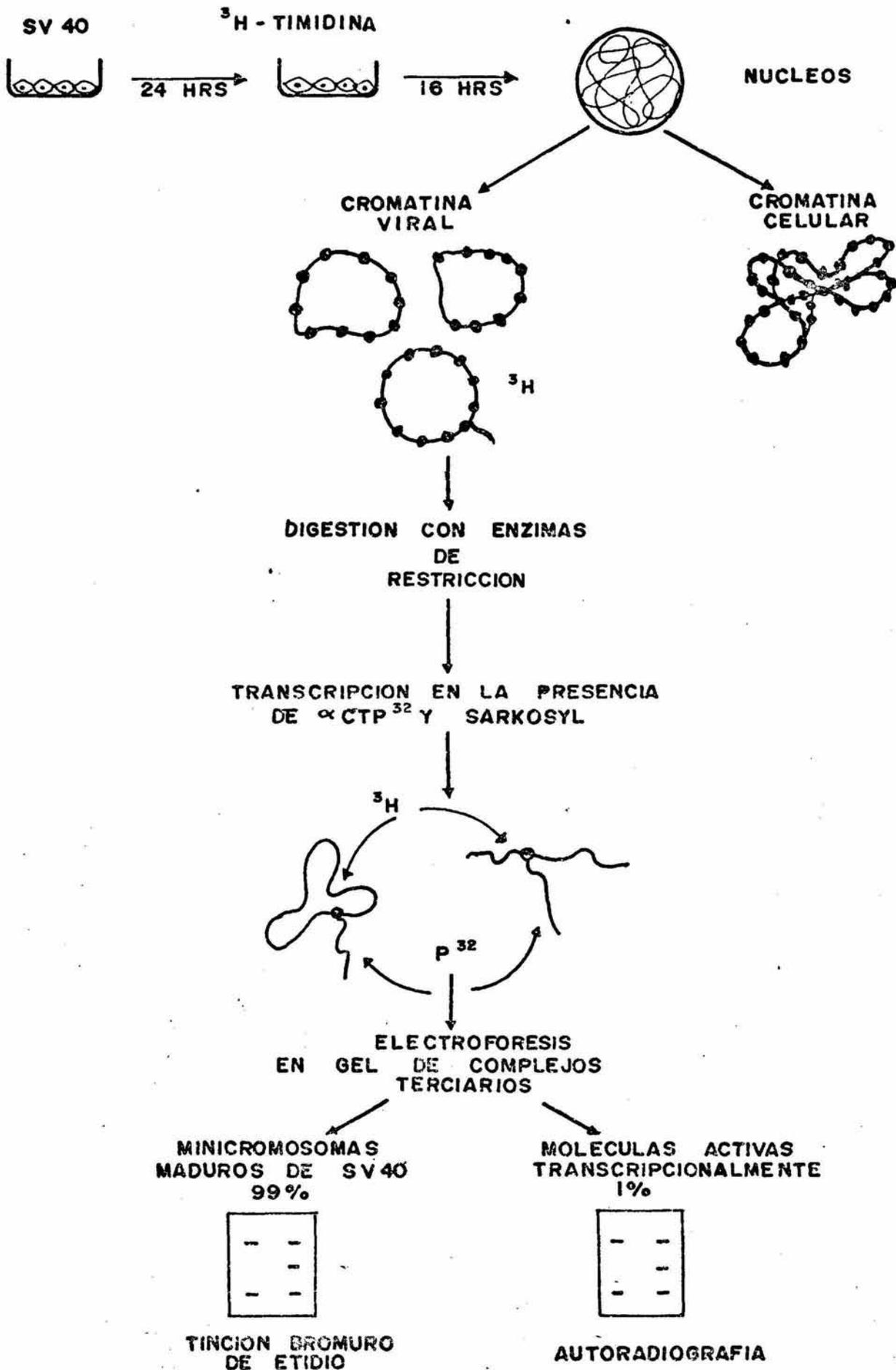
La composición final del amortiguador de digestión fue: 10% aproximadamente de sacarosa, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, TEA-HCl 10 mM pH 7.5, Cl_2Mg 4 mM, DTT 1 mM y PMSF 0.1 mM.

Las enzimas de restricción provenían de Bethesda Research Laboratories Inc. o de Amersham International, con una actividad de 5-10 U/ μ l. La digestión se llevo a cabo por 20 minutos a 37°C.

En caso necesario, cuando la cantidad de enzima a adicionar era menor de 1.5 μ l, se diluyó en amortiguador TEA-HCl 10 mM pH 7.5, NaCl 100 mM y EDTA 1 mM al volumen deseado. Al finalizar la incubación, los tubos se colocaron inmediatamente en hielo y se añadió EDTA a una concentración final de 15 mM; o bien se adicionó mezcla de reacción y sarkosyl al 1% final para los ensayos de transcripción.

TRANSCRIPCIÓN IN VITRO DE MINICROMOSMAS DE SV40. La mezcla de reacción estándar (115 μ l) contenía de 1 a 1.5 μ g de minicromosomas de SV40, 88 mM de TEA-HCl pH 7.5, NaCl 288 mM, PMSF 0.08 mM, $SO_4(NH_2)$ 150 mM, MnCl 2,2 mM, DTT 1.7 mM, ATP, CTP y GTP 1 mM, $\alpha^{32}P$ -CTP 10 μ M. (410 Ci/mmol) y Sarkosyl al 1%. La reacción se llevó a cabo a 32°C por 5 minutos y la síntesis se paró por enfriamiento de los tubos en baño de hielo, además de agregar EDTA a una concentración final de 15 mM. En algunos casos, la síntesis de RNA se determinó midiendo la incorporación de ^{32}P al material retenido sobre filtros DE/81 después de 6 lavados con una solución que contenía $Na_2 HPO_4 \cdot 12H_2O$ (P/V) al 10%, $Na_4P_2O_7$ 0.5% (P/V) y SDS 0.01% (P/V), seguidos por dos lavados con agua y

FIGURA 7. Esquema general para la detección de sensibilidad a enzimas de restricción en minicromosomas de SV40 activos en Transcripción.



etanol. Los filtros fueron secados y contados en una solución de PPO-POPOP-Tolueno ya descrita.

ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA. Se prepararon dos sistemas de geles, uno para resolver la migración de complejos replicativos y otro para complejos transcripcionales. En el primero, se utilizó una solución de agarosa Tipo II (Sigma) al 1% en amortiguador Tris -Acetatos 40 mM pH 7.9, Acetato de Sodio 20 mM y EDTA 1 mM. Se disolvió calentando en horno de microondas y se dejó enfriar hasta 40 °C. Posteriormente se vació sobre una cámara para electroforesis horizontal. Las muestras se prepararon adicionando SOS a una concentración final de 1%, azul de bromofenol 0.01% y sacarosa al 15% en caso de que las muestras carecieran de ella, se calentaron en baño maría por 5 minutos a 65°C y se colocaron en los carriles del gel. La electroforesis se llevo a cabo durante 18 horas a 100 volts y a temperatura ambiente recirculando el amortiguador.

Cuando el colorante llegó al frente del gel, este se sumergió en una solución de Bromuro de Etidio (1 µg/ml) durante 20 minutos. El gel se observó con luz ultravioleta en una cámara oscura y se tomó una fotografía con película polároid tipo 55 ó 57.

Para los complejos transcripcionales, el gel fue al 1.2% en un amortiguador Tris-Acetatos 40 mM pH 7.6, Acetato de Sodio 20 mM y EDTA 1 mM. Se disolvió calentando en un horno de microondas y se dejó enfriar para agregar Bromuro de Etidio a una concentración final de 0.01%.

La muestra se colocó directamente en el carril del gel. La electroforesis se llevó a cabo de 16 a 20 horas a 70 volts y a temperatura ambiente recirculando el amortiguador. Una vez concluida la electroforesis, el gel se lavó de 4-5 veces con agua bidestilada estéril, se fotografió y se secó directamente bajo presión reducida sin calor por dos horas y con calor 1 hora y se expuso sobre una película X-Omat AR (Kodak) a -70°C .

FLUOROGRAFIA DE GELES DE AGAROSA. La fluorografía se llevó a cabo empleando el método propuesto por Laskey, W. (66). Los geles se sumergieron en metanol y se mantuvieron durante 30 minutos en agitación y temperatura ambiente por dos periodos. Posteriormente se cambió a un baño de solución metanol-PPD 10% y se dejó en agitación por 3 horas. Transcurido este tiempo, se eliminó el exceso de PPD con metanol y se dejó precipitar el PPD impregnado al gel sumergiéndolo en agua por 30 minutos. Se secó sobre papel Whatman en las condiciones ya mencionadas. Los geles desecados se expusieron sobre películas presensibilizadas X-Omat AR (Kodak) a -70°C .

PRESENSIBILIZACION DE PELICULAS. La película X-Omat Ar se expuso a destellos luminosos producidos por una unidad fotográfica de destellos que contaba con un filtro naranja YA3, como se describió en (66).

El ajuste para la intensidad luminosa se logró variando la distancia entre la película y la fuente de luz y/o el diámetro de la apertura sobre el filtro. Se determinó la absorvancia de la película tomando regiones de la misma preexpuesta a distintas

condiciones y midiendo la densidad óptica a 540 nm en un espectrofotómetro Zeiss. La distancia y apertura de la fuente de luz que se hizo incidir sobre la película se eligió cuando se registró una densidad óptica de 0.15. La película presensibilizada se puso en contacto con el gel previamente secado y se mantuvieron a -70°C durante el tiempo necesario.

RESULTADOS

PRESENCIA DE LA ESTRUCTURA GAP EN MINICROMOSOMAS ACTIVOS EN REPLICACION.

I.- Purificación de minicromosomas de SV40.

La primera parte del proyecto destinada a determinar si existía una relación directa entre la estructura gap y el proceso de replicación, requería de contar con minicromosomas con una estructura lo más parecida a la existente in vivo. Para lograrlo, se procedió como primer objetivo a desarrollar la metodología propuesta por Varshavsky A. (65) para extraer minicromosoma de SV40 a partir de células infectadas; dicho método se basa en el empleo de concentraciones fisiológicas de sal (0.14M NaCl).

La Figura 8, muestra el perfil de sedimentación de los minicromosomas maduros de SV40 extraídos bajo condiciones fisiológicas y purificados a través de un gradiente lineal de sacarosa del 5 al 25%.

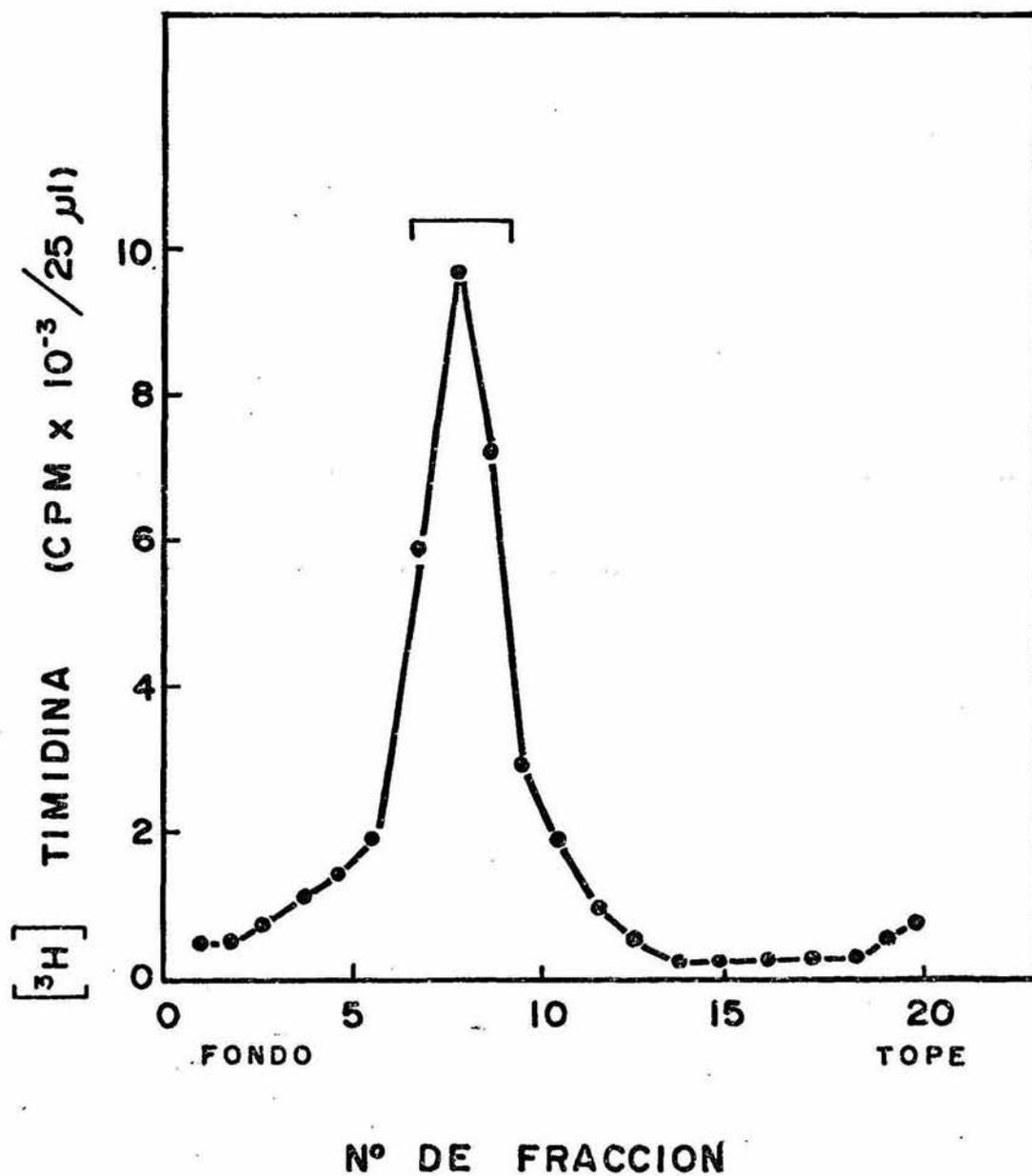
Como se puede apreciar, los minicromosomas maduros (aquellos inactivos en replicación y/o transcripción) se con-

FIGURA 8. Patrón de sedimentación de complejos nucleoprotéicos de SV40.

Células CV1 fueron crecidas e infectadas con SV40 como se describe en Materiales y Métodos y marcadas por un periodo de 16 horas con ^3H -Timidina (5 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$).

40 horas después de la infección, los minicromosomas se extrajeron con la metodología descrita por Varshavsky, A (65) y se sometieron a centrifugación por sedimentación en un gradiente lineal de sacarosa del 5 al 25% a 45,000 rpm por 53 min. en un rotor SW50.1 a 4°C.

Se colectaron 20 fracciones de 250 μl y se tomaron alícuotas de 25 μl para determinar radioactividad TCA precipitable.



centran en una región específica del gradiente que comprende a las fracciones encerradas por el corchete. Este patrón de sedimentación se reprodujo en todas las purificaciones realizadas.

Del gradiente, se tomaron las fracciones indicadas, se mezclaron y se cuantificó el DNA obtenido mediante el método de Burton descrito en Materiales y Métodos obteniéndose un rendimiento de 6 a 7 µg de DNA por cada 7 millones de células infectadas con SV40.

II.- Patrón de restricción de minicromosomas maduros con las enzimas ECO RI Y BAM HI.

Bajo las condiciones de extracción empleadas, se ha reportado que sólo el 30% aproximadamente de los minicromosomas maduros presentan la región desprovista de nucleosomas (gap) (24).

La única secuencia de reconocimiento de la enzima Bgl I sobre el genoma de SV40 se halla en la región donde se forma el gap (0.67 U.M.). Dado que esta enzima solo es capaz de cortar el DNA en regiones del mismo desprovistas de nucleosomas, se empleó como detector de complejos nucleoprotéicos con gap.

Inicialmente, se decidió realizar una cinética de restricción usando concentraciones variables de la enzima Bgl I manteniendo constante la cantidad de minicromosoma, con el

fin de determinar la concentración óptima de enzima para una determinada cantidad de minicromosomas.

Se purificaron minicromosomas maduros, se tomaron las fracciones indicadas y alícuotas conteniendo 2 µg de DNA se ajustaron a las condiciones descritas en Materiales y Métodos para restringir con la enzima BglI a concentraciones de 1 a 15 U/µg de DNA. Una vez restringidos los minicromosomas se sometieron a electroforesis en gel de agarosa. En la Figura 9 se muestra la fotografía del gel. Como se observa, al utilizar concentraciones de enzima entre 5 a 15 U/µg de DNA, se encontró que solo el 30% del total de las moléculas pasaban a la forma lineal del DNA (forma III) mientras que el 70% restante permanece en la forma circular (forma II) o en la forma superenrollada (forma I); es decir, solo el 30% de los minicromosomas maduros son accesibles a la enzima.

El control en este caso, fue minicromosomas incubados en ausencia de enzima (carril 3) y DNA desprovisto de proteínas (carriles 1 y 2), el cual se lineariza en casi un 50% cuando solo se emplearon 0.5 U DE BglI/µg de DNA (carril 1); se decidió emplear 10 U de BglI/µg de DNA para ensayos posteriores.

En resumen, estos resultados muestran que 30% de las moléculas de minicromosomas presentan la región gap como ya ha sido reportado (24).

Por otra parte, se decidió analizar el patrón de restricción de minicromosomas por enzimas que reconocen secuen-

FIGURA 9. Sensibilidad de minicromosomas maduros a la enzima de restricción Bgl I.

Las fracciones limitadas por el corchete en la Figura 8, se mezclaron y se tomaron alícuotas de 70 μ l para restringir con concentraciones crecientes de la enzima BglI.

Carril 1 DNA de SV40 restringido con 0.5U de BglI/ μ g de DNA.

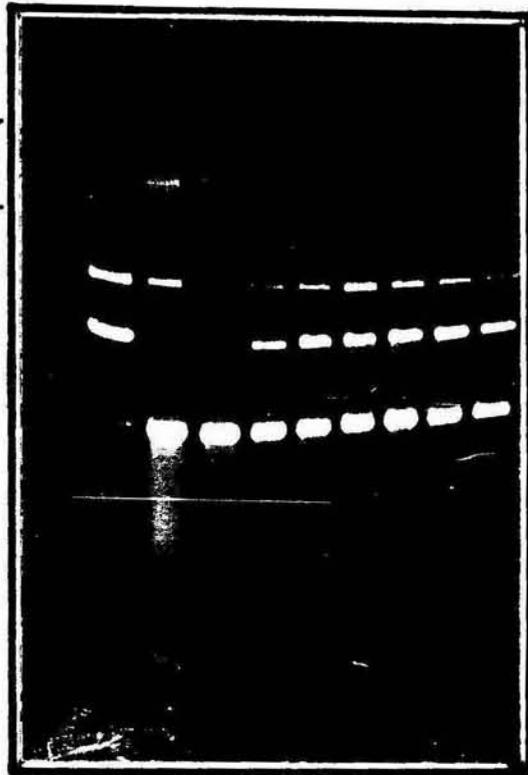
Carril 2 DNA de SV40 sin restringir.

Carril 3 minicromosomas de SV40 sin restringir.

Carriles 4, 5, 6, 7, 8 y 9 minicromosomas maduros de SV40 digeridos con 1, 3, 5, 7, 10 y 15U de BglI/ μ g de DNA respectivamente.

1 2 3 4 5 6 7 8 9

I R {
FORMA II
FORMA III
FORMA I



cias fuera del gap.

Se emplearon las enzimas de restricción EcoRI y Bam HI las cuales tienen una sola secuencia de reconocimiento en el genoma viral pero que a diferencia de BglI se encuentran fuera de la región donde se forma el gap.

Se purificaron minicromosomas maduros, se restringieron con 10 U de cada una de las enzimas mencionadas y se sometieron a electroforesis en gel de agarosa. La Figura 10 muestra la fotografía de este gel donde se aprecia que el porcentaje de moléculas que pasa a la forma lineal y que por consecuencia es accesible a las enzimas, representa alrededor de 30% independientemente de la enzima empleada, lo que sugiere una distribución azarosa de nucleosomas en los minicromosomas restringidos.

En resumen, hasta aquí se contaba con un método de purificación de minicromosomas de SV40 en su forma nativa, se conocía su patrón de restricción para las enzimas Bgl I, Eco RI y Bam HI y se contaba con la enzima Bgl I como detector de minicromosomas con gap.

II.- Purificación de minicromosomas activos en replicación.

Para determinar si minicromosomas activos en replicación presentaban o no la estructura gap, fue necesario implementar la separación parcial de minicromosomas maduros de

FIGURA 10. Patrón de restricción de minicromosomas maduros de SV40 digeridos con las enzimas BglI, EcoRI y BamHI.

De las fracciones comprendidas en el corchete de la Figura 8, se tomaron alícuotas de 70 μ l y se restringieron con las enzimas BglI, EcoRI y BamHI.

Carril 1 y 6 minicromosomas maduros sin ser restringidos.
Carril 2 y 3 minicromosomas digeridos con 10U de BglI/ μ g de DNA.

Carril 4 minicromosomas digeridos con 10U de EcoRI/ μ g de DNA.

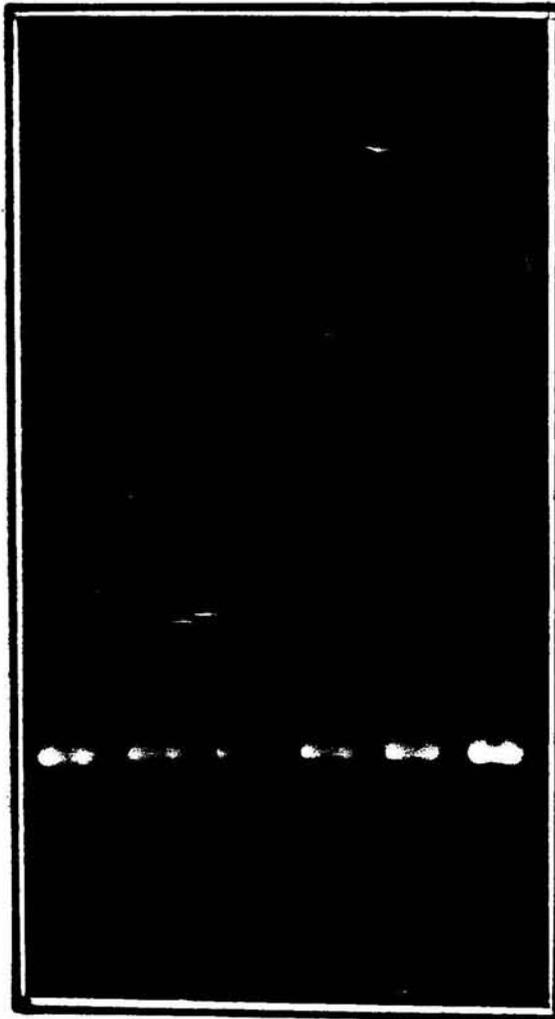
Carril 5 minicromosomas digeridos con 10U de BamHI/ μ g de DNA.

1 2 3 4 5 6

FORMA II

FORMA III

FORMA I



aquellos que se hallaban replicando.

Para lograr la separación fue necesario marcar diferencialmente las dos poblaciones.

Se decidió suministrar Timidina-¹⁴C por 16 horas a los cultivos de células infectadas para marcar todas aquellas moléculas sintetizadas durante este periodo y a las 40 horas postinfección, dar un pulso de 5 minutos con Timidina-³H para marcar solo aquellas moléculas activas en replicación en ese momento, ya que se ha reportado que la replicación del minicromosoma viral toma 15 minutos (16).

Inmediatamente después del pulso, la extracción de los minicromosomas se realizó bajo el procedimiento descrito y la purificación de estos se hizo a través de un gradiente lineal de sacarosa del 5 al 25%.

En la Figura 11 se muestra el perfil de sedimentación de los minicromosomas maduros y de los intermediarios replicativos, observándose una sedimentación diferencial de dos poblaciones de DNA con coeficientes de sedimentación reportados de 75S para los minicromosomas maduros y 90 S para los activos en replicación (67).

La separación entre ellos no es óptima dado que se traslapan en una región lo que podría ocasionar problemas en posteriores análisis.

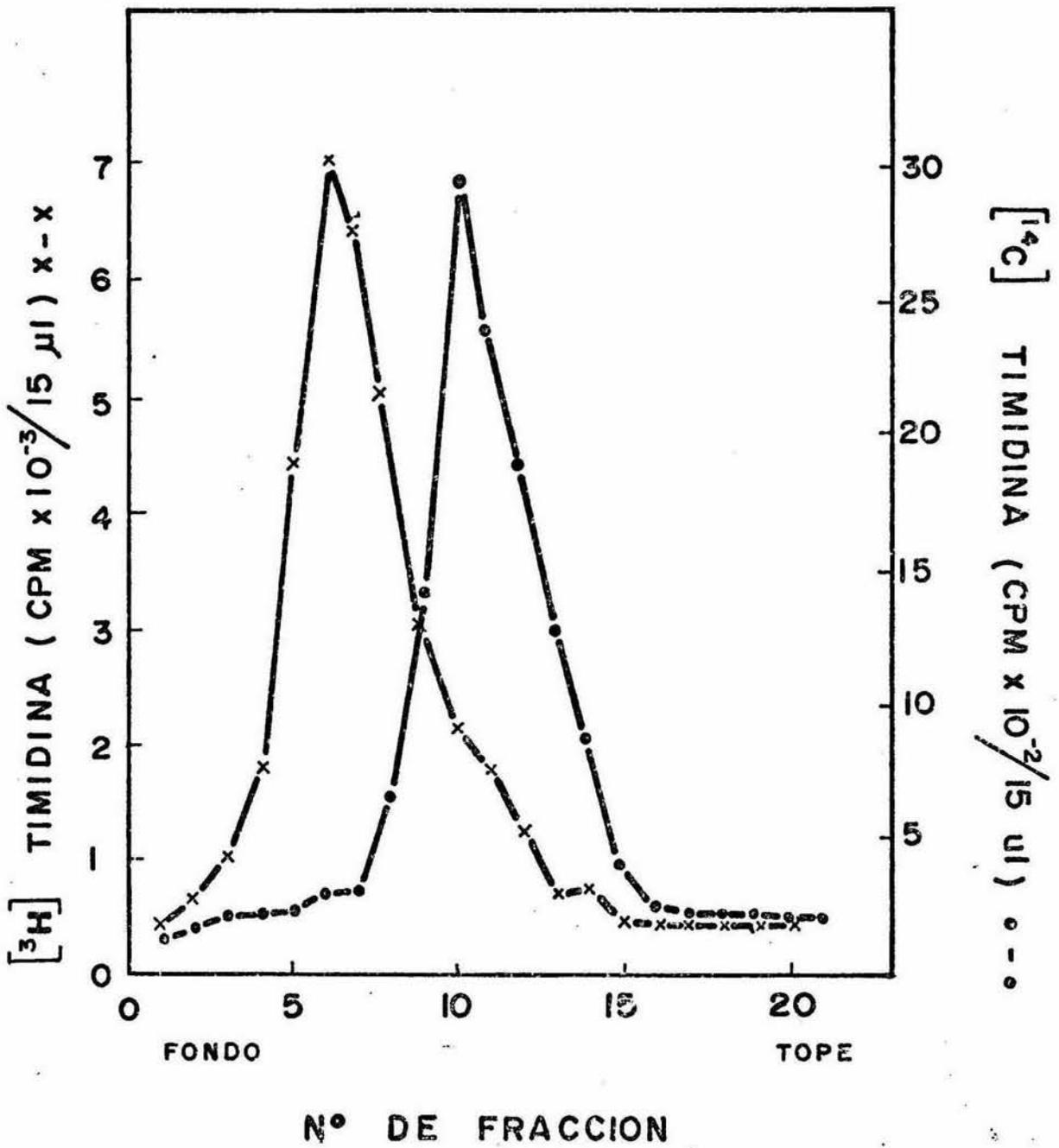
Optamos por marcar a las células infectadas únicamente con Timidina-³H durante 5 minutos, extraer minicromosomas y purificarlos a través del gradiente lineal de sacarosa, y de

FIGURA 11. Perfil de sedimentación de minicromosomas maduros y activos en replicación.

Células CV1 infectadas con SV40 fueron marcadas por un período de 16 horas con ^{14}C -Timidina (2.5 $\mu\text{Ci}/\text{caja}$).

40 horas después de la infección, las células se marcaron por un período de 5 minutos (pulso) con 100 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ de ^3H -Timidina, inmediatamente se extrajeron los minicromosomas y se sedimentaron a través de un gradiente lineal de sacarosa del 5 al 25%.

Se colectaron 20 fracciones de 250 μl y se tomaron alícuotas de 15 μl para determinar radioactividad TCA precipitable.



esta manera evitar la contaminación de radiactividad aportada por los minicromosomas maduros.

En el panel A de la Figura 12, se muestra el perfil de sedimentación de las moléculas marcadas durante el pulso, con una sedimentación similar a la observada para los complejos activos en replicación en la Figura 11.

Contando ya con el sistema de purificación parcial de minicromosomas activos en replicación, se procedió a analizar si presentaban la estructura gap utilizando a la enzima BglI como detector.

IV.- Relación entre el gap y los minicromosomas activos en replicación.

Ya que la población de moléculas activas en replicación es heterogénea dado que la infección no es sincrónica, fue necesario implementar una estrategia que permitiera analizar por separado a las moléculas en cada paso de la replicación.

La estrategia empleada se eligió tomando en cuenta que la sedimentación de los intermediarios replicativos está relacionada con lo avanzado que se encuentren en el proceso de replicación, es decir, tendrán un mayor coeficiente de sedimentación aquellas moléculas que estén terminando de replicarse, mientras que aquellas que estén iniciando su replicación sedimentarán más lentamente que éstos, mientras que aquellos que no replican sedimentarán en la región de los

minicromosomas maduros.

Los complejos activos en replicación durante el pulso con ^3H -Timidina se extrajeron y sedimentaron a través del gradiente de sacarosa. Posteriormente a la sedimentación, el gradiente se fraccionó como se indica (mediante corchetes) en la Figura 12; las diferentes fracciones fueron mezcladas y ajustadas a las condiciones de restricción para la enzima *EgII*. Una vez digeridas las moléculas, se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1% en amortiguador Tris-Acetatos pH 7.9, ya que este sistema permite la separación de los intermediarios replicativos de las otras formas del DNA (I, II, III).

La fotografía del gel se muestra en la Figura 12 panel B, donde se puede apreciar la migración de las moléculas maduras pero no la de los Intermediarios replicativos ya que estos solo representan el 5% de la totalidad de los minicromosomas. En el gel se aprecia sin embargo, el incremento en la cantidad de DNA a medida que las fracciones tomadas se acercan al tope del gradiente, donde se encuentran los minicromosomas maduros (ver Figura 11), los cuales muestran el patrón de restricción característico para la enzima *EgII*, es decir, 30% se hallan en la forma III después de la restricción si se compara con el que no fue restringido.

Con este gel se determinó que tanto la migración del DNA como la restricción eran buenas. Sin embargo, ya que el análisis iba dirigido a determinar la presencia de la región

FIGURA 12. Patrón de restricción de minicromosomas activos en replicación digeridos con la enzima BglII.

Células CV1 fueron marcadas por un pulso de 5 minutos con ³H-Timidina 40 horas después de la infección, se extrajeron los minicromosomas y se sedimentaron en un gradiente lineal de sacarosa del 5 al 25% (A).

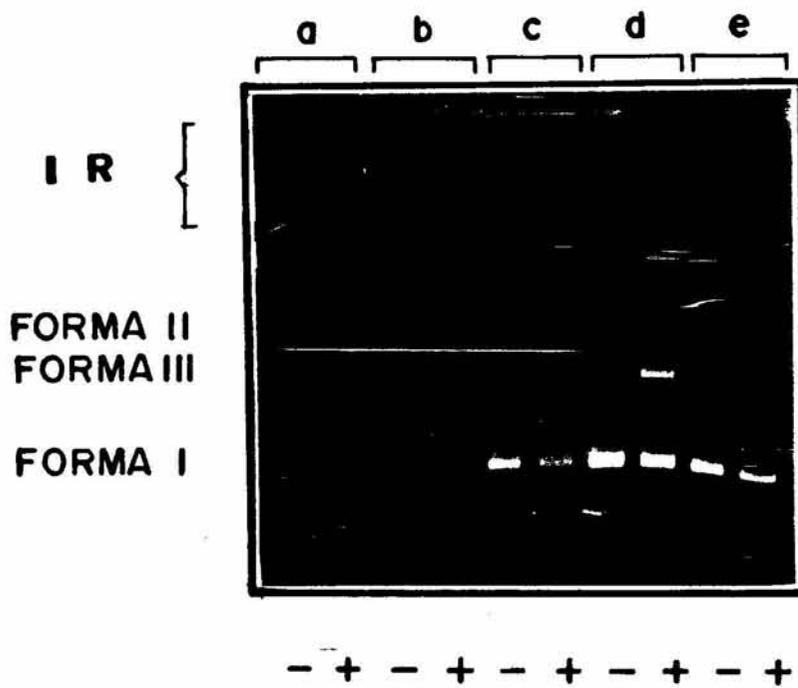
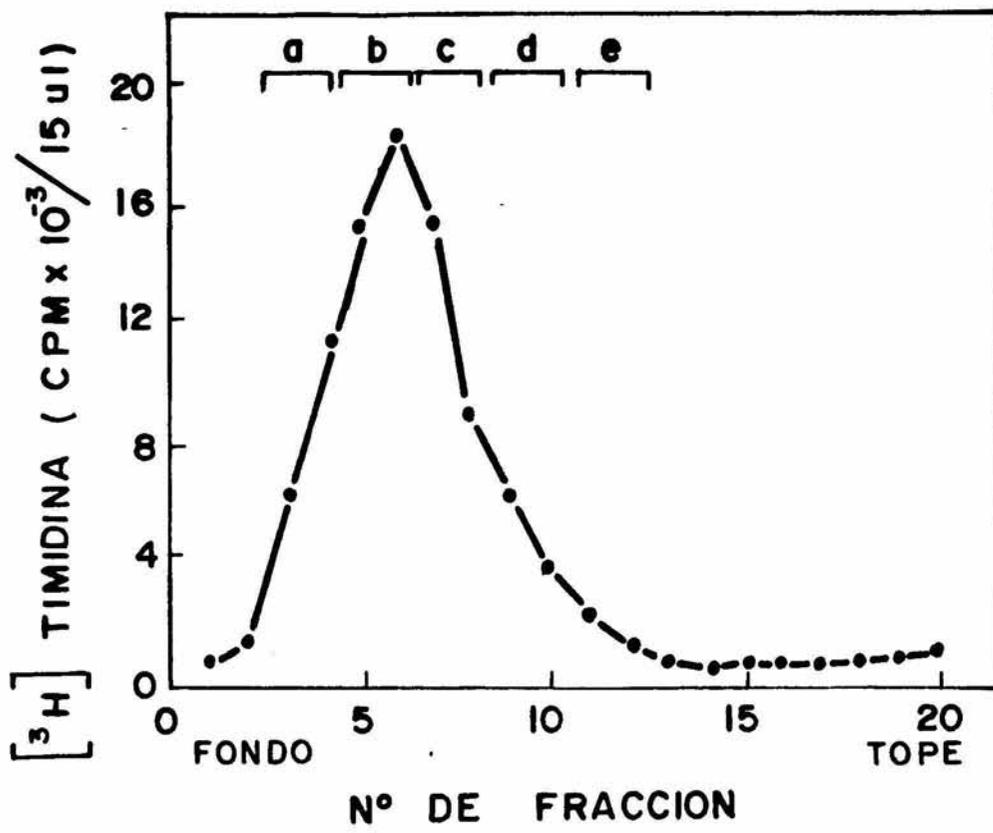
Las regiones comprendidas entre corchetes, fueron mezcladas y se tomaron alícuotas de 70 µl para restringir con la enzima BglII. Inmediatamente después, los complejos fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa (B).

El gel fue sometido a tratamiento fluorográfico y se secó en condiciones de vacío y calor; posteriormente se puso en contacto con una película para rayos X presensibilizada tipo OMAT-AR durante 8 días (C).

Las letras a, b, c, d y e, representan las fracciones analizadas.

(-) Minicromosomas sin ser restringidos.

(+) Minicromosomas digeridos con 10 U de BglII/µg de DNA.



gap en minicromosomas activos en replicación, se obtuvo la autoradiografía del gel después de un tratamiento fluorográfico (Figura 12 panel C), y se sometió a densitometría .

Al comparar las moléculas sin restringir con aquellas restringidas, se observa que sólo del 20 al 30% presentan accesibilidad a la enzima, lo que sugiere que sólo este porcentaje presenta la región gap, independientemente de la etapa de replicación en la que se encuentren.

Se analizó también la accesibilidad de los intermediarios replicativos a las enzimas EcoRI Y BamHI. En esta ocasión, solo se tomó la región b que se muestra en la Figura 12 para hacer la restricción.

Después del tratamiento con cantidades excesivas de cada una de las enzimas los complejos activos en replicación fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa. La Figura 13 muestra la autoradiografía del gel la cual fue analizada por densitometría.

Es evidente de esta Figura, que el acceso para las enzimas BamHI y EcoRI es diferente al de BglI tanto cualitativa como cuantitativamente, sugiriendo que alguna forma de maduración de nucleosomas en la cromatina viral se lleve a cabo alrededor de los sitios EcoRI, BamHI.

En resumen, los resultados sugieren que la estructura gap no se halla presente en minicromosomas activos en replicación como un requisito para que el evento se lleve a cabo, sin embargo existe la posibilidad que esta estructura sea

FIGURA 13. Complejos nucleoprotéicos activos en replicación digeridos con las enzimas BglI, EcoRI y BamHI.

Las fracciones comprendidas en el corchete b de la Figura 12, se mezclaron y se tomaron alícuotas de 70 μ l para someter a digerir con las enzimas BglI, EcoRI y BamHI. Posteriormente, se incluyeron en un sistema de electroforesis sobre gel de agarosa al 1% con amortiguador Tris-Acetatos pH 7.9 (ver Materiales y Métodos).

La autoradiografía del gel después de 7 días de exposición es mostrada.

Carril 1 complejos digeridos con 10U de BglI/ μ g de DNA.

Carril 2 con 10U de EcoRI/ μ g de DNA.

Carril 3 con 10U de BamHI/ μ g de DNA.

Carril 4 complejos sin ser digeridos.

1 2 3 4

I.R.

FORMA II

FORMA III

FORMA I



formada inmediatamente después de finalizar la replicación por lo que se decidió continuar con la siguiente estrategia.

V.- Análisis de minicromosomas que recién completaron su replicación

40 horas después de infección, células CV 1 fueron marcadas por un pulso de 5 minutos con ^3H -Timidina. Se retiró el exceso de marca y se mantuvieron en medio de caza (el cual se describe en Materiales y Métodos) por 10 ó 45 minutos.

En la Figura 14 panel A, se muestra el perfil de sedimentación de minicromosomas luego de 10 minutos de caza. Se puede observar como los minicromosomas que se hallaban más avanzados en su replicación en el momento del pulso, llegan al estado maduro durante el período de caza acumulándose en la región de los minicromosomas maduros, mientras que aquellos muy tempranos en replicación durante el pulso permanecen en la región de los intermedios replicativos.

Se tomaron las fracciones que se muestran entre corchetes, se analizaron por restricción con la enzima Bgl I y se sometieron a electroforesis en gel de agarosa. En el panel B, se muestra la autorradiografía la cual fue sometida a análisis densitométrico mostrando que la enzima reconoce aproximadamente el mismo número de moléculas activas en replicación como aquellas que terminaron de replicarse.

El análisis de una caza de 45 minutos se muestra en la

FIGURA 14. Sensibilidad a la enzima *EgII* de minicromosomas activos en replicación después de una caza de 10 minutos.

Células CV1 fueron marcadas con un pulso de 5 minutos 40 horas después de la infección; el medio con la marca fue retirado y se adicionó medio de caza conteniendo un exceso de Timidina no marcada, por un período de 10 minutos. Posteriormente, los complejos fueron extraídos y purificados a través de un gradiente lineal de sacarosa de 5 a 25%.

En (A), se muestra el perfil de sedimentación de los complejos. Las fracciones entre corchetes se mezclaron y se tomaron alícuotas de 70 μ l para restringir con la enzima *EgII*. Inmediatamente después, los minicromosomas fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa. En (B), se muestra la autoradiografía del gel.

Las letras a, b, c y d representan las fracciones analizadas.

(-) Minicromosomas sin ser digeridos.

(+) Minicromosomas digeridos con 10 U de *EgII*/ μ g de DNA.

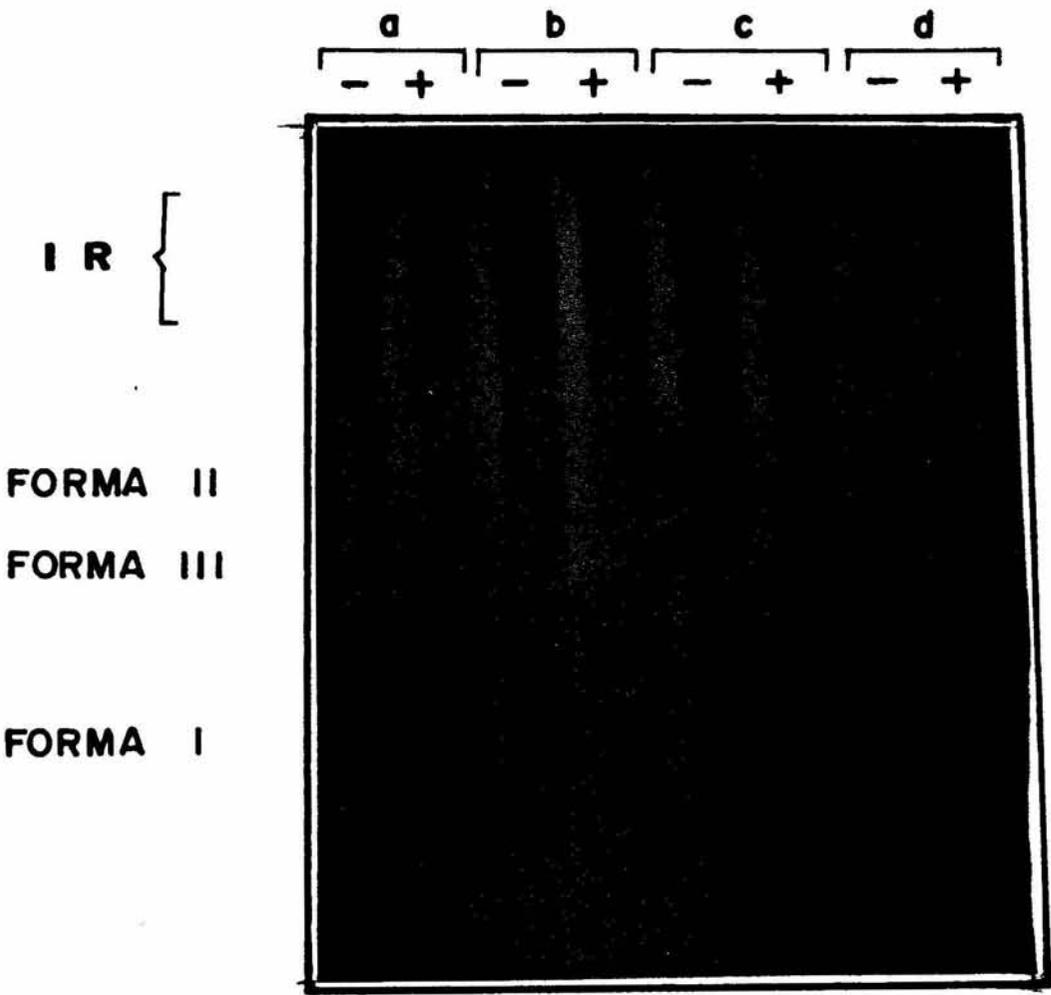
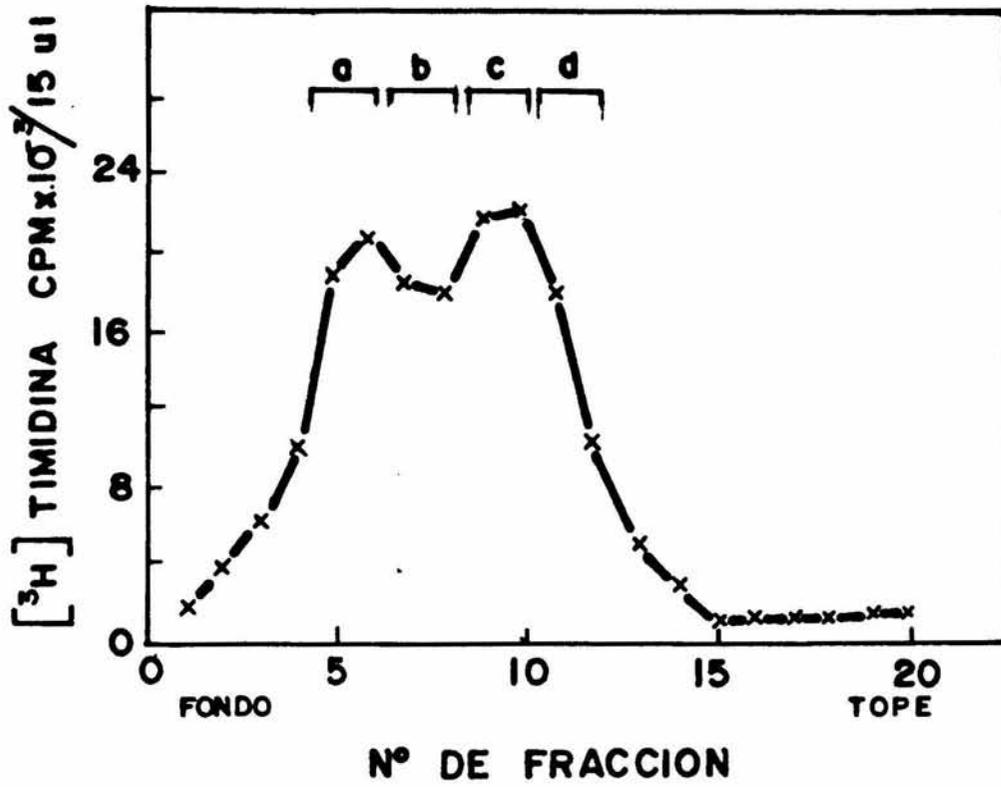


Figura 15. En el panel A, el patrón de sedimentación muestra que todas las moléculas que se hallaban replicando y que por lo tanto se marcaron durante el pulso de 5 minutos, han completado su maduración, concentrándose en la región de los complejos maduros.

Se hizo un análisis de las moléculas distribuidas en el gradiente tomando las fracciones que se muestran entre corchetes, digiriéndolas con la enzima BglI y sometiéndolas a electroforesis en gel de agarosa. La autoradiografía del gel se muestra en la Figura 15 panel B. El patrón de restricción observado para las moléculas analizadas, es el mismo que para los minicromosomas maduros (ver Figura 9), como lo reveló el análisis densitométrico, por lo que la posibilidad que la estructura gap se forme en los minicromosomas durante la maduración es poco probable.

En resumen, se observa que, tanto las moléculas que se hallan activas en replicación, como aquellas que recién replicaron, muestran el mismo patrón de restricción para la enzima BglI que aquel mostrado por los minicromosomas maduros; es decir, solo el 30% aproximadamente de las moléculas es sensible a la acción de la enzima. Estos datos por tanto sugieren que la estructura gap no se halla presente de manera preferencial en moléculas que están replicando por lo que tal vez esta estructura no sea un requisito para que el proceso de replicación se lleve a cabo.

FIGURA 15. Sensibilidad a la enzima de restricción BglI de minicromosomas que recién terminaron de replicarse.

Células CV1 fueron infectadas con SV40. 40 horas después las células se marcaron por un pulso de 5 minutos con 100 μ ci/ml de 3 H-Timidina y cazadas por un período de 45 minutos en medio conteniendo un exceso de Timidina no marcada.

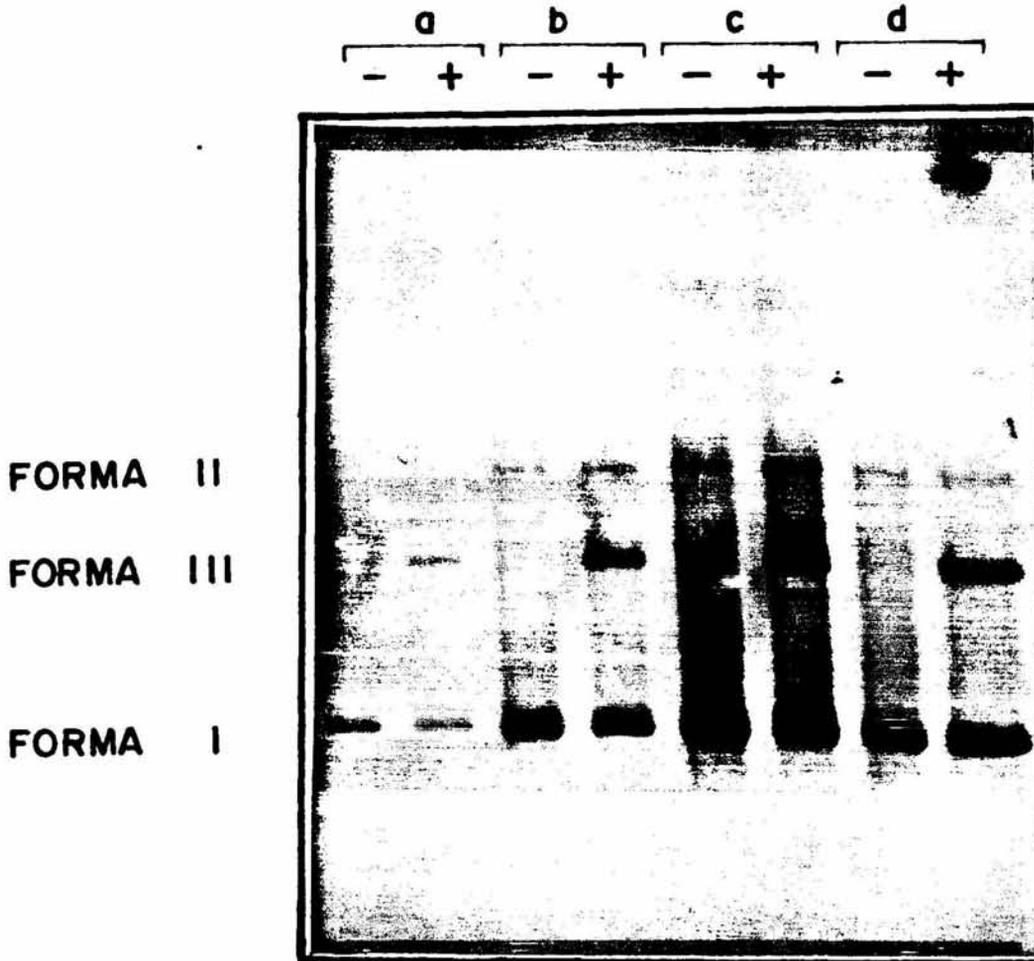
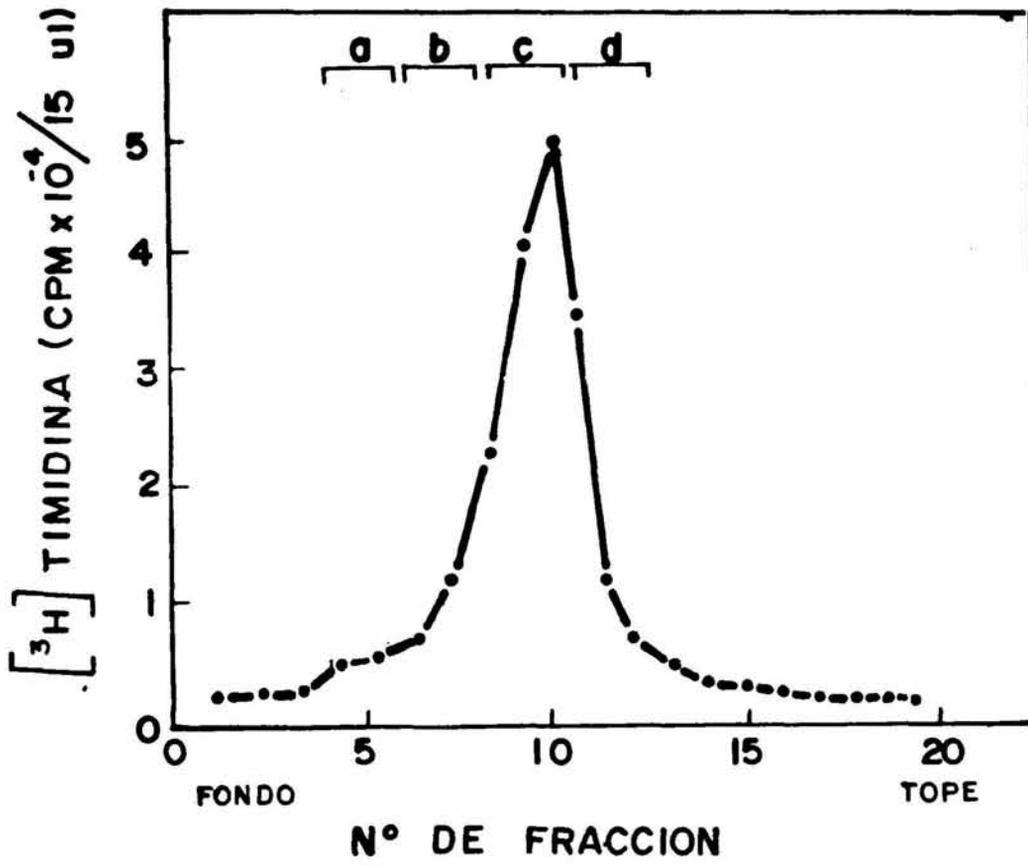
En (A), se muestra el patrón de sedimentación minicromosomas a través de un gradiente lineal de sacarosa del 5 al 25%.

Las fracciones mostradas entre corchetes, se mezclaron y alícuotas de 70 μ l se digirieron con 10U de BglI/ μ g de DNA. Los minicromosomas después de ser digeridos se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1%. En (B), se muestra la autoradiografía del gel.

Las letras a, b, c y d representan las fracciones analizadas.

(-) Minicromosomas sin ser digeridos.

(+) Minicromosomas digeridos con 10 U de BglI/ μ g de DNA.



PRESENCIA DEL GAP EN MINICROMOSOMAS ACTIVOS EN ---
TRANSCRIPCIÓN.

Los siguientes experimentos estuvieron encaminados en tratar de determinar si la estructura gap se halla presente en moléculas transcripcionalmente activas. Se ha reportado, que sólo el 1% de los minicromosomas de SV40 presentes en una célula se hallan activos en transcripción (56), por lo que se requiere de condiciones adecuadas para detectar este bajo porcentaje de moléculas y analizar de manera eficiente si presentan o no la región gap.

La estrategia desarrollada se basó en un sistema propuesto por Gariglio (68) que emplea el detergente aniónico sarkosyl. Este detergente desplaza casi todas las proteínas asociadas al DNA pero deja unida a la RNA polimerasa que ha iniciado la transcripción, impidiendo además, que nuevas moléculas de polimerasa se unan al DNA, para reiniciar síntesis. En este sistema, las cadenas de RNA ya iniciadas in vivo pueden ser alargadas y marcadas radioactivamente in vitro (32 P-CTP), siendo fácilmente identificables dado que la mayoría de las proteínas unidas al DNA son solubilizadas por el sarkosyl, permitiendo que el complejo terciario (DNA-RNA polimerasa-RNA), sea analizado a través de electroforesis en geles de agarosa.

Células CV1, fueron infectadas con SV40 y marcadas por un periodo de 16 horas con 3 H-Timidina, para marcar todas las moléculas sintetizadas durante este periodo de infección y así

localizar a los minicromosomas maduros por su sedimentación en un gradiente lineal de sacarosa.

En la Figura 16 panel A, se muestra el perfil de sedimentación característico de los complejos nucleoprotéicos maduros y el corchete indica las fracciones que se mezclaron para realizar los ensayos de transcripción. Estas fracciones se tomaron hacia el fondo del gradiente ya que se ha reportado (36) que el coeficiente de sedimentación de moléculas activas en transcripción es ligeramente superior que el coeficiente 75 S de los minicromosomas maduros debido a la RNA polimerasa (PM 500,000 d) y a la cadena de RNA que se está sintetizando.

Se tomaron alícuotas de la mezcla de fracciones conteniendo minicromosomas transcripcionalmente activos, y se restringieron con concentraciones crecientes de las enzimas Eco RI y BglI, posteriormente se transcribieron in vitro en presencia de 1% de detergente sarkosyl y α -³²P-CTP (Materiales y Métodos) por un período de 15 minutos a 32 C.

Inmediatamente después de que la reacción in vitro fue detenida por la adición de EDTA, los minicromosomas fueron sometidos a electroforesis en gel horizontal de agarosa al 1.2%. La fotografía del gel se muestra en el panel B de la Figura 16, donde se aprecia la migración electroforética de las moléculas maduras de SV40 y el patrón de restricción característico para cada una de las enzimas empleadas. Dicho patrón responde directamente a la concentración de la enzima hasta que se alcanza el límite de restricción para cada una de ellas, es decir, que solo

FIGURA 16. Sensibilidad de complejos nucleoprotéicos transcripcionalmente activos a enzimas de restricción.

Minicromosomas de SV40 se extrajeron y purificaron a través de un gradiente lineal de sacarosa del 5 al 25% en las condiciones descritas en Materiales y Métodos. En (A) se muestra el perfil de sedimentación.

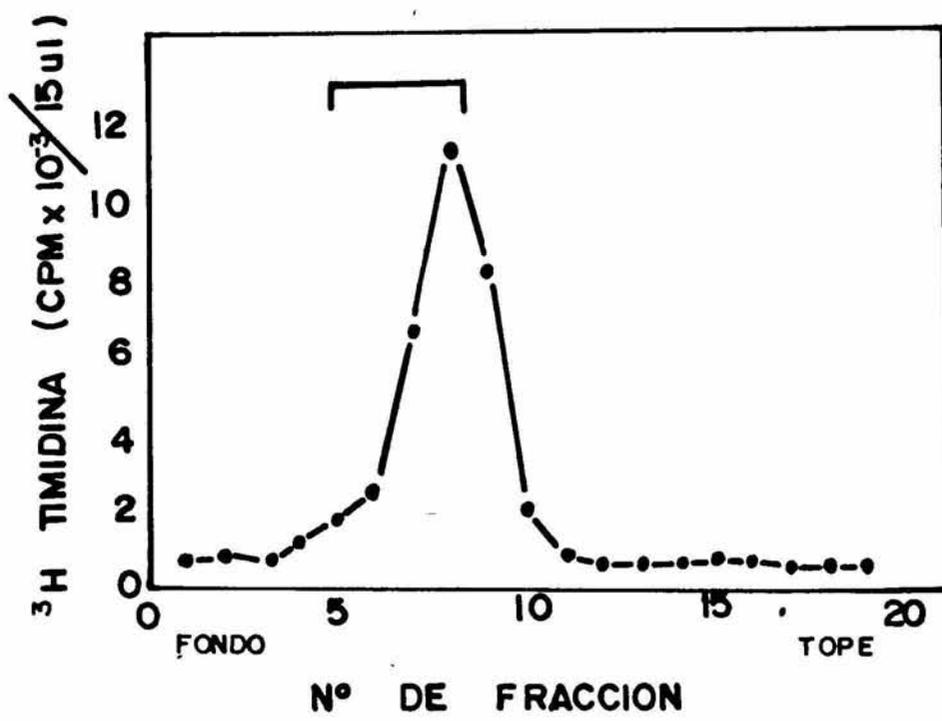
Las fracciones comprendidas entre el corchete, fueron mezcladas; se tomaron alícuotas de 70 μ l y se digirieron con las enzimas EcoRI y BglI durante 20 minutos a 37°C. Después de la restricción, a estas mismas alícuotas se les agregó una mezcla de transcripción conteniendo sarkosyl (1% final) y α -³²P-CTP. Se incubaron durante 15 minutos a 32°C. Inmediatamente después, los minicromosomas se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1.2% en amortiguador Tris-Acetatos pH 7.6. En (B) se muestra la fotografía del gel.

El gel se secó y se expuso sobre una película para rayos X tipo OMAT-AR durante 2 días. En (C) se muestra la autoradiografía.

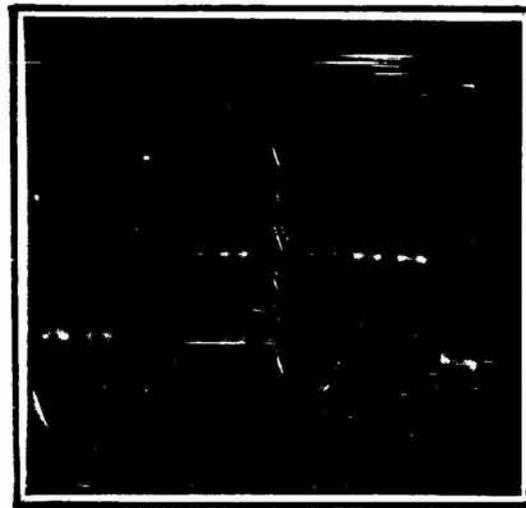
Carriles 1 y 10 minicromosomas sin ser digeridos, pero en 1 fueron sometidos a transcripción in vitro.

Carriles 2, 3, 4 y 5 minicromosomas restringidos con 1, 3, 5 y 15U de EcoRI/ μ g de DNA respectivamente.

Carriles 6, 7, 8 y 9 minicromosomas restringidos con 1, 3, 5 y 15U de BglI/ μ g de DNA respectivamente.

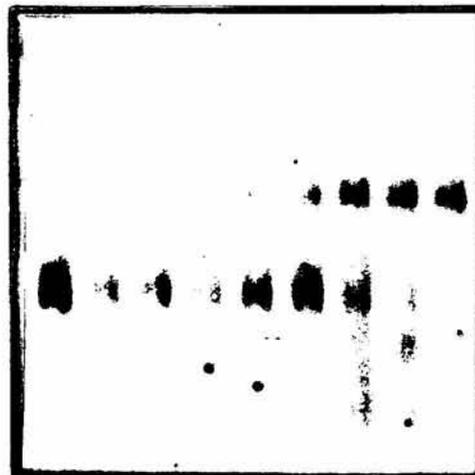


FORMA II
FORMA III
FORMA I



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

FORMA II
FORMA III
FORMA I



el 30% de la población total de minicromosomas es digerido.

La determinación de las moléculas activas en transcripción se logró al secar el gel y exponerlo sobre una película de rayos X, de esta manera la radioactividad asociada a ellas se imprimió en dicha película.

En el cuadro C de la Figura 16, se muestra la autoradiografía del gel, la cual fue sometida a análisis densitométrico. El patrón de restricción con Eco RI de las moléculas activas en transcripción, muestra que sólo un bajísimo porcentaje de ellas (aproximadamente 10%) es digerida con la enzima aún a concentraciones de 15U de enzima/ μ g de DNA. Sin embargo, el efecto provocado por la restricción con la enzima BglI es totalmente diferente, observándose una linearización de un alto porcentaje de las moléculas a una concentración de sólo 3U de enzima/ μ g de DNA.

El que solamente un bajo porcentaje de minicromosomas activos en transcripción sea sensible a la enzima EcoRI, sugiere que la mayoría de ellos presentan probablemente un nucleosoma que bloquea las secuencias de reconocimiento para la enzima. El que se emplee a la enzima BglI como detector de moléculas con gap y la evidencia presentada en este trabajo, sugieren que las moléculas activas transcripcionalmente presentan la región gap.

DISCUSION.

Se ha sugerido, que la actividad genética depende de las secuencias del DNA y de la estructura de la cromatina (69), por lo que parece probable que la estructura determine, al menos en parte, donde y cuando la transcripción y replicación deben ocurrir.

El hecho de que los nucleosomas no impidan los procesos de transcripción y replicación (20, 56), no descarta la posibilidad de que una estructura clave de cromatina se requiera en las regiones necesarias para la iniciación de la síntesis de DNA o RNA.

La estructura gap encontrada en aproximadamente 30% de los minicromosomas maduros de SV40 (24), se consideró como un posible factor regulador de la expresión viral, concediendo a los que la presentaban cualidades para replicarse y/o transcribirse.

Por medio de un marcaje diferencial, se logró identificar minicromosomas maduros y minicromosoma activos en replicación (Figura 11), analizarlos mediante el empleo de enzimas de restricción y de esta manera definir si presentaban la región gap.

Los resultados presentados en las Figuras 9 y 12, muestran que minicromosomas maduros así como aquellos activos en replicación, muestran una estructura similar, es decir, sólo una población representando el 30% del total, presentan accesibilidad a

la enzima BglI, sugiriendo que sólo este porcentaje de moléculas presentan el gap, por lo que tal vez una estructura de este tipo no determine que el proceso de replicación se lleve a cabo.

Sin embargo, el hecho de emplear a la enzima BglI como detector, lleva a considerar la posibilidad de que el efecto observado no sea realmente el existente in vivo.

Se sabe por ejemplo, de la participación en el evento de iniciación de la replicación de enzimas tales como la DNA polimerasa, topoisomerasas, girasas, factores de iniciación y en el caso de SV40 del antígeno T. (18), que pudieran estar asociados directamente a la región gap, bloqueando el acceso de la enzima de restricción BglI, impidiéndole discernir entre las dos poblaciones de minicromosomas. Dentro de estos elementos, tal vez uno de los más importantes a nivel de replicación viral sea el Antígeno T. Esta proteína se halla asociada al menos a 50% de las moléculas activas en replicación (70), y al parecer solo se requiere al inicio de la síntesis de DNA. Una de sus tres secuencias de reconocimiento sobre el DNA, se traslapa con el sitio de restricción de la enzima BglI. Un reporte reciente, prueba que el Ag T asociado a minicromosomas, bloque el acceso a enzimas de restricción (71), lo que apoya la sugerencia planteada.

Como se observa en la Figura 13, el porcentaje de moléculas activas en replicación restringidas con EcoRI y BamHI, con secuencias de reconocimiento a la mitad y final de la cadena en replicación (ver figura 3), es superior que el observado para la enzima BglI por lo menos 1.5 veces. Estos resultados apoyan la

sugerencia planteada sobre el impedimento de restricción para la enzima BglI por factores involucrados e la iniciación de la replicación.

Sin embargo, los resultados obtenidos a partir de los ensayos de pulso-caza (Figuras 14 y 15), que permitirían determinar si esta región se desbloqueó una vez que factores de iniciación de la replicación ya no se requieren, muestran que minicromosomas que recién terminaron de replicarse no son restringidos preferencialmente por la enzima BglI como era de esperarse si se considera que la maquinaria de replicación ha abandonado el gap.

Este efecto se puede deber sin embargo, a que el porcentaje de moléculas que no fue digerido con la enzima reingresaron al proceso de replicación, asociándose nuevamente con factores de iniciación.

Por último, se ha propuesto que la cromatina celular así como la viral se hallan asociadas a la matriz nuclear durante su replicación (72). El hecho de emplear una concentración fisiológica de sal durante la extracción de los minicromosomas, podría impedir el contar con la totalidad de las moléculas en replicación ya que estas condiciones de salinidad no desprenderían a las moléculas que se hallan estrechamente unidas a proteínas de matriz, provocando un análisis parcial de minicromosomas activos en replicación.

Todas estas posibilidades planteadas, requieren de sistemas adecuados para ser descartadas. El empleo de mutantes TsA de SV40 las cuales sintetizan un Ag T sensible a la temperatura podrían

responder en parte estos planteamientos.

RELACION ENTRE MINICROMOSOMAS ACTIVOS EN TRAN- SCRIPCION Y LA ESTRUCTURA GAP.

Varios estudios dirigidos a delucidar la estructura de genes activos en transcripción han sido reportados, pero ninguno de ellos muestra claramente una estructura específica que se asocie con el evento de síntesis de RNA (27).

Evidencias acumuladas, por ejemplo, indican que genes celulares transcripcionalmente activos pueden ser detectados como cromatina expuesta, cuando se prueba su sensibilidad a nucleasas. En particular ha sido demostrado que el extremo 5' regulador de los genes de la globina, insulina e histonas, muestran una sensibilidad incrementada a nucleasas en células que transcriben estos genes, mientras que aquellas que están latentes para expresarlos, no muestran tal sensibilidad (28, 29).

Mediante el método descrito en este trabajo, se logró marcar de manera diferencial moléculas que estaban transcribiendo in vivo a través de un sistema de transcripción in vitro en presencia del detergente aniónico sarkosyl y del precursor radioactivo ³²P(α)-CTP, de tal manera que se pudo analizar la estructura nativa de estas moléculas y definir si presentaban la estructura gap.

Los resultados en la Figura 16, muestran que minicromosomas activos en transcripción, son preferencialmente accesibles a la

acción de la enzima BglI, lo que sugiere que la región gap se halla presente en estas moléculas.

El que la región gap sea hipersensible a la acción de nucleasas y dado que esta estructura se halla en minicromosomas activos en transcripción, hace posible sugerir que una estructura similar se encuentra en genes celulares activos, siendo la formación de esta estructura uno de los primeros pasos en la activación de un gen.

En apoyo al posible función de esta región durante la transcripción, viene de experimentos que demuestran la eficiente iniciación de la transcripción del RNAm tardío de SV40 a partir de esta región cuando RNA polimerasa de E. coli fue incubada con minicromosomas virales y no así cuando se incubó con DNA desnudo de SV40 (73).

Una posible función de la región gap, podría estar relacionada directamente con alguna de las secuencias comprendidas en ella.

Como ya ha sido mencionado (introducción), dentro del gap se hallan además de las secuencias promotoras, las secuencias repetidas de 72pb con actividad aumentadora de la transcripción a través de su unión a factores de iniciación de la transcripción como ha sido sugerido recientemente por Jongstra, J. (61), por lo que parece posible que se requiera una estructura del tipo gap para que la maquinaria de transcripción se una al templado e inicie la síntesis de RNA.

Por último, el hecho de que solo el 1% de los minicromosomas

de SV40 se encuentren activos en transcripción, mientras que existe un 30% de moléculas potenciales para transcribir, sugiere que la estructura gap no es el único requisito para que el evento de transcripción se lleve a cabo, requiriéndose tal vez de concentraciones adecuadas de un factor específico de iniciación o bien de la misma RNA polimerasa II responsable de la síntesis in vivo de los RNA mensajeros (74).

En resumen, los resultados obtenidos a través de este trabajo, muestran que la presencia del gap en minicromosomas de SV40 esta asociada directamente con el evento de transcripción, no así con el de replicación, apoyando que la estructura de la cromatina juega un papel crucial en la regulación de la expresión genética.

REFERENCIAS.

- 1.- Lehninger, A. L. (1980) BIOQUIMICA. 2da. edición. Editorial Omega, S. A. España.
- 2.- Von Holt, L. (1979) FEBS Lett. 100: 201-218.
- 3.- Elgin, T. y Weintraub, H. (1975) Annu. Rev. Biochem. 44:725-774.
- 4.- Kornberg, R., Thomas, J. (1974) Science 184:865-868.
- 5.- Shaw, B., Herman, T., Van Holde, K. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 505-509.
- 6.- Noll, M. (1974) Nature 251:249-251.
- 7.- Hjelm, R., Kneale, G., Suau, P., Bradbury, E., Ibel, K. (1977) Cell 10:139-151.
- 8.- Griffith, J. D. (1975) Science 187:1202-1203.
- 9.- Varshavsky, A.J., Bakayev, V., Oshumachov, P. y Georiev, G. (1977) Nucleic. Acid. Res. 3:2101-2113.
- 10.- Thoma, F., Koller, T. y Klug, A. (1979) J. Cell. Biol. 83:274-280.
- 11.- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Martin, R., Roberts, K. y Watson, J. (1983) Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing, Inc. USA.
- 12.- Peterson, J., Mc Conkey, E. (1976) J. Biol. Chem. 251: 548-554.

- 13.- Pederson, T. (1977) *Biochemistry* 16:2771-2777.
- 14.- Isackson, T. y Reeck, J. (1981) *Cell* 27:453-460.
- 15.- Groudine, M., Das, J., Nerman, P. y Weintraub, H. (1978) *Cell* 14: 865-878.
- 16.- Cremisi, C. (1979) *Microbiol. Rev.* 43:297-319.
- 17.- Lewin, B. (1980) "Gene Expression" vol 2, Second Edition, Eucaryotic Chromosomes. John Wiley & Sons.
- 18.- Tjian, R. (1981) *Cell* 26:1-2.
- 19.- Mc Knight, S., y Miller, O. (1977) *Cell* 12:795-804.
- 20.- Cremisi, C., Chestier, A. y Yaniv, M. (1978) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 42:409-416.
- 21.- Seale, R. (1975) *Nature* 225:247-249.
- 22.- Seale, R. y Simpson, R. (1975) *J. Mol. Biol.* 94: 479-501.
- 23.- Scott, W. y Wigmore, D. (1978) *Cell* 15:1511-1518.
- 24.- Saragosti, S., Moyne, G. y Yaniv, M. (1980) *Cell* 20:65-73.
- 25.- Tien-Kuo, M., Sahasrabudde, C. y Saunders, G. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73:1572-1575.
- 26.- Gariglio, P., Llopis, R., Oudet, P. y Chambon, P. (1979) *J. Mol. Biol.* 131:75-105.
- 27.- Weintraub, H. y Groudine, M. (1976) *Science* 193:848-856.
- 28.- Bellard, M., Gannon, F. y Chambon, P. (1977) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 42:779-791.
- 29.- Wu, C., Wong, Y. y Elgin, S. (1979) *Cell* 16:807-814.
- 30.- Ponet, A. y Cedar, H. (1977) *Cell* 11:933-940.
- 31.- Keene, M., Corces, V., Lowenhaupt, K. y Elgin, S. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:143-146.

- 32.- Weisbrod, S., Groudine, M. y Weintraub, H. (1980) *Cell* 19:289-301.
- 33.- Albright, S., Nelson, P. y Garrad, W. (1979) *J. Biol. Chem.* 254:1065-1073.
- 34.- Nelson, D., Perry, M. y Chalkley, R. (1979) *Nucleic Acid. Res.* 6:561-574.
- 35.- Mathis, D. y Chambon, P. (1982) *Nature* 290:310-315.
- 36.- Bensimhou, M., Gabarro-Arpa, R., Ehrlich, T. y Reiss, C. (1983) *Nucleic Acids Res.* 11:4521-4540.
- 37.- Wasylyk, B. y Chambon, P. (1982) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 47:503-514.
- 38.- Igo-Kemenes, T. (1982) *Ann. Rev. Biochem.* 31:89-121.
- 39.- Sweet, B. y Hilleman, M. (1960) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 105:420-427.
- 40.- Tooze, J. (1980) *DNA Tumor Viruses* 2a. Edition. CSH USA.
- 41.- Fiers, W., Contreras, R., Halgeman, G., Rogiers, R., Van de Voorde, A., Van Heuverswyn, H., Van Herreweghe, J., Volkaert, G. y Ysebaert, M. (1978) *Nature* 273:113-120.
- 42.- Noll, M. y Kornberg, R. (1977) *J. Mol. Biol.* 109:393-404.
- 43.- Tegtmeyer, P. (1972) *J. Virol.* 10:591-598.
- 44.- Bersmang, D., Olive, D., Hartzell, S. y Subramanian, K. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:381-385.
- 45.- Shortle, D. y Nathans, D. (1979) *J. Mol. Biol.* 131:801-817.
- 46.- Lewton, B. (1984) *J. Virol.* 49:9-13.
- 47.- Krauss, M., Gorlie, B., Boyne, M. y Benbow, R. (1984) *J. Virol.* 49:333-342.

- 48.- Buckler-White, A., Krauss, M., Pigiet, V. y Benbow, R. (1984) *J. Virol.* 43:885-895.
- 49.- Tack, L., Wassarman, P., DePamphilis, M. (1981) *J. Biol. Chem.* 256:8821-8828.
- 50.- Depamphilis, M. y Wassarman, P. (1980) *Ann. Rev. Biochem.* 49:627-666.
- 51.- Gariglio, P. y Mousset, S. (1975) *FEBS Lett* 56:149-155.
- 52.- Elder, J., Spritz, R. y Weissman, S. (1981) *Ann. Rev. Biochem.* 49:627-666.
- 53.- Benoist, C. y Chambon, P. (1982) *Nature* 290:304-310.
- 54.- Banerji, J., Fusconi, S. y Schaffener, W. (1981) *Cell* 27:299-308.
- 55.- Rio, D., Robbin, A., Myers, R., Tjian, R. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:5706-5710.
- 56.- Gariglio, P., Llopis, R., Oudet, P. y Chambon, P. (1979) *J. Mol. Biol.* 131:75-101.
- 57.- Piatak, M., Subramanian, K., Roy, P. y Weissman, S. (1981) *J. Mol. Biol.* 110:78-95.
- 58.- Waldeck, W., Fohring, B., Chowdhury, K., Gruss, P. y Sauer, G. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:5964-5968.
- 59.- Varshavsky, A., Sundin, O. y Bohn, M. (1979) *Cell* 16:453-466.
- 60.- Jakobovits, E., Bratosin, S. y Aloni, Y. (1982) *Virlogy* 120:340-348.
- 61.- Jongstra, J., Reudelhuber, T., Oudet, P., Benoist, C., Chae, C., Jeltsch, J., Mathis, D. y Chambon, P. (1984) *Nature*

307:708-714.

62.- Saragosti, S., Ceraghini, S. y Yaniv, M. (1982) J. Mol. Biol. 160:133-146.

63.- Dulbecco, R. y Freeman, G. (1959) Virology 85:396-397.

64.- Burton, K. (1956) Acid. Biochem. J. 62:315-323.

65.- Varshavsky, A., Sudin, O. y Bohn, M. (1978) Nucleic Acid Res. 5:3469-3478.

66.- Laskey, R. y Mills, A. (1975) Eur. J. Biochem. 56:335-341.

67.- Tack, L., Wasserman, P. y DePamphilis, M. (1981) J. Biol. Chem. 256:8821-8828.

68.- Gariglio, P. (1976) Differentiation 5:179-183.

69.- Palen, T. y Cech, R. (1984) Cell 36:933-942.

70.- Reiser, J., Renart, J., Crawford, L. y Stark, G. (1980) J. Virol. 33:78-87.

71.- Harper, F., Florentin, Y. y Puvion, E. (1984) EMBO J. 3:1235-1241.

72.- Hunt, B. y Vogelstein, B. (1981) Nucleic Acid Res. 9:349-362.

73.- Jakobovits, E., Saragosti, S., Yaniv, M. y Aloni, Y. (1980) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 77:6556-6560.

74.- Carrancá, A. (1985) Tesis de Maestría. CINVESTAV. IPN.