



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA

PURIFICACION DEL COMPLEJO DE REPLICACION
DE SV40 MEDIANTE EL USO DE LA PROTEINA 32
DEL BACTERIOFAGO T4 Y ANTICUERPOS CONTRA
ESTA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

ENRIQUE I. MIRANDA PERALTA

MEXICO, 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.

A MIS PADRES...

El presente trabajo está dedicado especialmente a mis padres, sin cuyo apoyo no hubiese sido posible la realización del mismo.

El presente trabajo se realizó bajo la dirección y -
asesoramiento del Dr. PATRICIO GARIGLIO VIDAL.

Profesor Titular y Coordinador Académico del Dpto. de
Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y
Estudios Avanzados del I.P.N.

Un especial reconocimiento para la Dra. Annick Chestier y el M. en C. Alejandro Garcia por sus comentarios y sugerencias durante el desarrollo de la presente tesis.

Me siento muy agradecido con la Q.F.B. Consuelo Rodríguez y la Biol. Edith Garay, las cuales se hicieron cargo del mantenimiento y suministro de las células eucarióticas utilizadas durante el presente trabajo.

He de expresar mi gratitud hacia el Biol. Pedro Chavez por su apoyo en la parte de microscopía electrónica, y también hacia Rogelio Alonso, Rocio Zamorano, Marco Antonio Meraz, - Luz Ma. Rangel, Francisco Campos, Floriberto Miguel y Ma. Luisa Esteves por su asistencia técnica en el laboratorio.

En general estoy agradecido con los integrantes del laboratorio # 24 así como del Dpto. de Genética del CINVESTAV-IPN - que de cualquier forma me apoyaron durante la realización de - éste trabajo.

Les agradezco a las siguientes personas sus comentarios y correcciones al manuscrito del presente trabajo: M. en C. - Sergio Vaca, M. en C. Sergio Gonzalez, Biol. Martha Salcedo, - Biol. Ramon Victor Moreno y Q.B.P. Bulmaro Correa.

Este trabajo fué apoyado en gran parte por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, No. de Registro 44618 y - Proyecto CONACyT "El Minicromosoma de SV40 como modelo de - estudio de la Transcripción y la Replicación de la Cromatina Eucariótica".

R E S U M E N

Los mecanismos implicados en la replicación de los cromosomas eucarióticos aun no son bien entendidos. Los virus animales representan sistemas modelo muy útiles para el estudio de tales mecanismos, pero se tiene que lograr la purificación total de los cromosomas activos en replicación para caracterizar a las proteínas que permanecen unidas a esos cromosomas y demostrar su función en la replicación del DNA. En éste trabajo se describen las bases de un método para lograr la purificación total de complejos replicativos de SV40 que han sido parcialmente purificados en un gradiente de sacarosa. El método consiste en un sistema de inmunoprecipitación con anticuerpos y proteína 32. Se montaron las condiciones óptimas de concentración, temperatura y tiempo de incubación para la proteína 32 así como para los anticuerpos. El porcentaje máximo de precipitación obtenido fué de un 60-70%.

- A, Ac.- Anticuerpos.
- A1.- Cadenas pesadas de los anticuerpos.
- A2.- Cadenas ligeras de los anticuerpos.
- APS.- Persulfato de Amonio.
- ^{14}C .- Isótopo Carbono catorce.
- CM-Celulosa.- Carboximetil-Celulosa.
- CV1.- Línea celular establecida a partir de mono verde africano.
- DEAE-Celulosa.- Dietilaminoetil-Celulosa.
- DNasa I.- Desoxirribonucleasa I.
- DTT.- Ditiotreitól.
- EDTA.- Acido Etilendiaminotetracético.
- F I.- DNA superhelicoidal de SV40.
- F II.- Forma circular del DNA de SV40.
- F III.- Forma lineal del DNA de SV40.
- ^3H .- Tritio (isótopo del hidrógeno).
- h.p.i.- Horas post-infección.
- Kd.- Kilodaltones.
- M9.- Medio mínimo 9.
- moi.- Multiplicidad de Infección.
- Mr.- Masa relativa de una molécula en daltones.
- P.- Precipitado compuesto por complejos replicativos de SV40, -
proteína 32 y anticuerpos.
- P1.- Complejos replicativos de SV40 parcialmente purificados en
un gradiente de sacarosa.
- P2.- Complejo maduro de SV40 purificado en un gradiente de saca
rosa.
- P32.- Proteína codificada por el gene 32 del bacteriofago T4.
- PFU.- Unidades formadoras de placa.

PMSF.- Fenilmetilsulfonilfluoruro.
POPOP.- p-bis[2(5-feniloxazolil)] benzeno.
PFO.- 2,5-Difeniloxazole.
R.- Complejos replicativos de SV40 en gel de agarosa.
R I.- Intermediario replicativo.
SDS.- Dodecil Sulfato de Sodio.
S L T .- Secuencia Líder Tardía.
SV40.- Virus de Simio 40.
T.- Antígeno de transformación celular codificado por los
Papovavirus.
TCA.- Acido Tricloroacético.
TEA.- Trietanolamina.
TEMED.- Trietilmetiletildiamino.
Tris.- Tris(hidroximetil)aminometano.
VP1, VP2 y VP3.- Proteínas de la cápside de SV40.

Índice.

Agradecimientos.....	1
Resumen.....	ii
Abreviaturas.....	iii
I.- INTRODUCCION.....	1
Estructura de la Cromatina..	2
Replicación de la Cromatina..	7
Aislamiento de la Cromatina Activa en Replicación...	17
Objetivo del Trabajo y Estrategia Experimental..	21
II.- MATERIAL Y METODOS.....	24
A.-Obtención y Purificación de Proteína 32..	24
1.-Propagación del Bacteriófago T4...	24
2.-Obtención de Bacterias <u>E. coli</u> B Infectadas con el Bacteriófago T4... ..	25
3.-Purificación de Proteína 32...	25
B.-Obtención y Purificación de Anticuerpos de Conejo - contra la Proteína 32....	28
1.-Obtención y Preservación del Suero....	28
2.-Purificación de γ -Globulinas..	29
C.-Obtención y Purificación de DNA Celular..	30
1.-Cultivo de Células....	30
2.-Marcaje y Extracción de DNA Celular...	30
3.-Purificación y Desnaturalización del DNA..	31
4.-Ensayo de Precipitación de DNA de cadena sencilla.	32
D.-Aislamiento e Inmunoprecipitación de Cromatina de - SV40.	32

1.-Propagación del Virus SV40.....	32
2.-Marcaje y Extracción de Complejos Nucleoproteicos de - SV40..	33
3.-Cuantificación de Cromatina de SV40....	35
4.-Ensayo de Immunoprecipitación de Cromatina de SV40....	36
E.-Análisis Electroforético de Cromatina de SV40....	36
1.-Electroforesis en Gel de Agarosa..	36
2.-Fluorografía y Autorradiografía....	37
3.-Electroforesis en Gel de Poliacrilamida-SDS...	38
4.-Tinción con Nitrato de Plata..	38
III.- RESULTADOS...	40
1.-Obtención de Proteína 32.	40
2.-Obtención de Anticuerpos de Conejo contra la Proteína 32.	43
3.-Obtención de DNA Celular.	48
4.-Immunoprecipitación Indirecta de DNA de cadena Sencilla..	48
5.-Immunoprecipitación Indirecta y Análisis Preliminar de - Cromatina de SV40 activa en Replicación..	51
IV.- ANALISIS DE RESULTADOS Y DISCUSION....	89
V.- CONCLUSION.	95
Referencias....	96

I N T R O D U C C I O N

A nivel biológico, el estudio de los organismos vivos ha conducido a tres grandes generalizaciones: (A) La teoría de la evolución por selección natural según la cual las plantas y animales de hoy derivan de los primeros organismos rudimentarios mediante un proceso continuo y evolutivo; (B) La teoría celular, es decir, el reconocimiento de que todos los organismos están constituidos por células; y (C) La teoría cromosómica de la herencia, la cual plantea que la función de los cromosomas es la de controlar la herencia.

Actualmente está bien establecido el concepto de que toda la información necesaria para el funcionamiento, el desarrollo, la adaptación, y la perpetuación de los organismos está almacenada en los cromosomas, y que éstos son moléculas de DNA. Además se ha confirmado que los cromosomas se encuentran divididos en unidades más pequeñas a las que se ha denominado genes, siendo éstos considerados como la unidad fundamental de información biológica (1).

En general, el flujo de la información genética va desde el DNA, a través de la producción de RNA (transcripción), hasta la síntesis de proteínas (traducción). Los productos de la expresión genética determinan estructuras y actividades celulares que permiten la organización de los organismos vivientes (1,2). Esta información contenida en los genes, habrá de ser preservada a través de las generaciones en las diferentes especies, con lo que se da el evento de la replicación del DNA.

En los organismos procariotes, los cuales tienen la característica de presentar solamente un cromosoma, el evento de la replicación resulta de la interacción de una proteína reguladora con una secuencia de origen en su DNA, y está directamente en función del medio ambiente (3).

En las células de los organismos eucariotes, la cuestión es mucho más compleja debido a que en éstos organismos existe una mayor cantidad de material genético (Fig. 1), hay una separación física entre la transcripción y la traducción, el DNA se encuentra acompañado a proteínas y RNA formando a la cromatina, y existen fenómenos asociados a la diferenciación. Además, la información genética de éstas células está contenida en varios cromosomas, y el genoma completo tiene que ser replicado precisamente una vez por cada división celular, surgiendo la incógnita de como es regulado el acto de la replicación del DNA a través del ciclo celular (3).

ESTRUCTURA DE LA CROMATINA.

Las proporciones relativas de los componentes de la cromatina, y su estructura, dependen críticamente del método de aislamiento así como del tejido de origen (4). 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 de DNA y consiste principalmente de cadenas nacientes asociadas al templado de DNA. Las proteínas de la cromatina se dividen en histónicas y no histónicas (3).

Fig. 1. En ésta micrografía electrónica se aprecia la enorme cantidad de material genético que contiene tan solo uno de los cromosomas (sin histonas) de una célula eucariótica (47).



Las histonas son proteínas básicas que se encuentran en la misma proporción (peso:peso) al DNA, y una de sus características es que están ampliamente conservadas en todos los eucariotes. Las histonas H3 y H4 (ricas en arginina) están entre las proteínas más conservadas en la evolución, mientras que las histonas H2A y H2B (ricas en lisina), aunque conservadas, presentan ligeras variaciones interespecíficas en sus secuencias. Por su parte, la histona H1 es muy variable entre las especies e incluso entre los tejidos (1,3,5).

Estudios tanto de microscopía electrónica como bioquímicos, muestran que la cromatina está organizada en unidades estructurales que compactan al DNA y se repiten regularmente -- como "cuentas de collar". A tales unidades se les ha denominado nucleosomas, los cuales contienen aproximadamente 200 pares de bases de DNA asociado a un octámero de histonas que consiste -- de dos copias de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4. El DNA nucleosomal puede ser dividido en dos regiones: el DNA -- central ("core") con una longitud invariable de 146 pares de -- bases (que se enrolla en el octámero de histonas dándole dos-vueltas); y el DNA eslabón ("linker") que puede variar en longitud desde 8 hasta 114 pares de bases y al cual se encuentra asociada la histona H1 (1,3,4).

La secuencia de nucleosomas regularmente espaciados -- organiza a la cromatina en una fibra de aproximadamente 100 Å. Esta fibra de 100 Å se puede enrollar en sí misma dando origen a la fibra de 250 Å, la que a su vez se enrolla formando los cromómeros, y éstos al empacarse aún más, forman el cromó-

soma metafásico (1,3,4).

Las proteínas no histonas son un grupo bastante heterogéneo de proteínas acídicas, constituyendo al menos 150 especies distintas, con pesos moleculares que oscilan entre 15,000 a 225,000 daltones (en el caso de las histonas, éstas oscilan entre 11,000 a 23,000 daltones). Cerca del 50% de las no histonas lo forman proteínas estructurales tales como alfa y beta-tubulina, actina, miosina, troponina y tropomiosina. Entre el 2 y el 4% de las proteínas no histónicas son proteínas que reconocen secuencias específicas en el DNA. Entre las proteínas restantes, se encuentran nucleasas, metilasas, fosforilasas, DNA y RNA polimerasas, proteínas del grupo de alta movilidad (HMG), ubiquitina, nucleoplasmina, proteasas, y tal vez muchas enzimas más (1,3,4).

En general el material cromosómico ha sido dividido en dos clases en base a observaciones citológicas durante el ciclo celular. La cromatina que sigue un ciclo, variando de un estado extendido en interfase a uno condensado en mitosis se llama eucromatina, la cual representa entre el 2 y el 20% del DNA, está constituida principalmente por la fibra de 100 Å, y es rica en proteínas no histónicas y en secuencias que forman parte de la población del RNA mensajero. Y la cromatina que se mantiene condensada en interfase, conocida como heterocromatina, que está formada por la fibra de 250 Å y es pobre en proteínas no histónicas. Esta heterocromatina a su vez, incluye dos tipos de material: la heterocromatina constitutiva, que se encuentra siempre condensada en las distintas células de un organismo lo

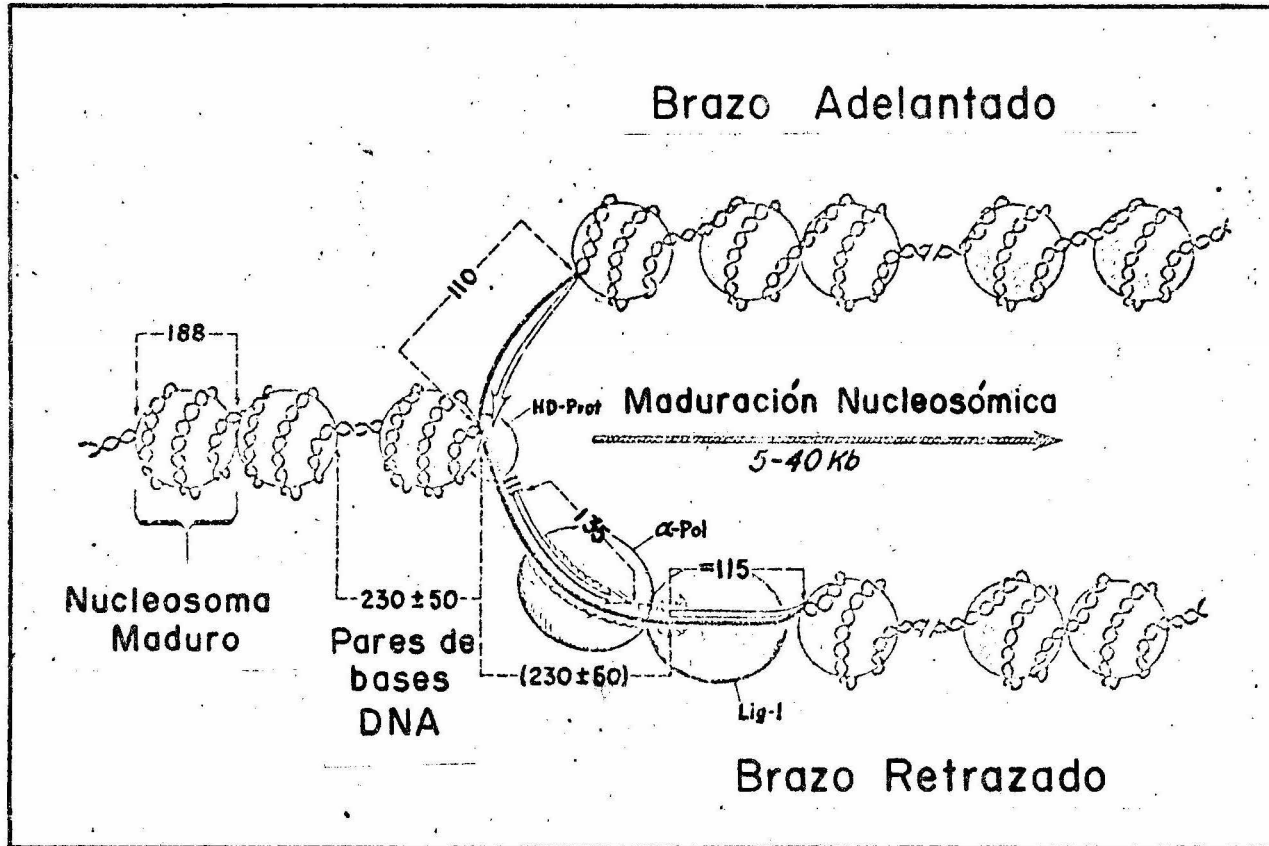
realizada en zonas bien definidas de los cromosomas (bandas C), carece de genes estructurales, contiene secuencias altamente repetitivas (DNA satellite), y se replica tardíamente en el período S; y la heterocromatina facultativa, que contiene secuencias de DNA que en otros tejidos o células están presentes como eucromatina, es inactiva en su expresión genética, no forma parte de las bandas C, y también es un replicador tardío en el período S (1,3,4,6).

Entonces la estructura de la cromatina juega un papel importante en la expresión de los genes. Ahora bien, como es que son mantenidos los estados de condensación y descondensación de la cromatina durante la replicación de los cromosomas, sin que se altere el patrón preciso de expresión genética que caracteriza a las células de cada tejido, a través de la división celular? (3).

REPLICACION DE LA CROMATINA.

La duplicación del DNA es generalmente un proceso complejo que involucra un conglomerado de actividades enzimáticas, y que actualmente está mejor entendido en los organismos procariontes gracias a los estudios in vitro de algunos de los componentes purificados, y su implicación in vivo por el efecto de las mutaciones en sus respectivos genes. Sin embargo, en el caso de los organismos eucariotes, los conocimientos son mucho más limitados (Fig. 2) y la mayoría de ellos se han obtenido por varias técnicas a partir de sistemas in vitro (3,5,6), contándose hasta

Fig. 2. Modelo de un tenedor de replicación eucariótico. Existe al menos una evidencia de cada uno de los componentes presentados, sin embargo la verdadera estructura del tenedor con todos sus componentes es aún desconocida (7). HD-Prot., proteína desestabilizadora de helice. α -Pol., DNA polimerasa α . Lig-I, ligasa I.

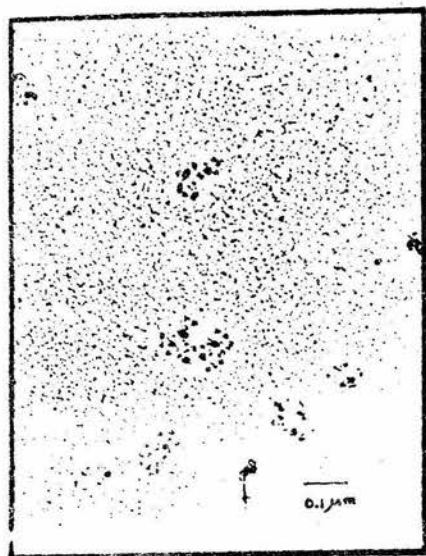


hasta el momento con la presencia de algunas mutantes en levadura, raton, y virus SV40 (7,17,55).

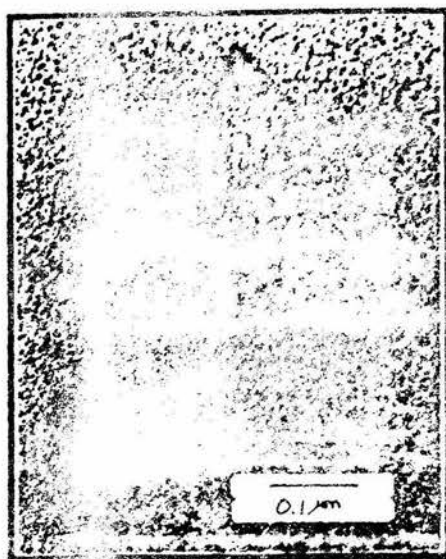
Estudios de autorradiografía y de microscopía electrónica han revelado la presencia de varios replicones a lo largo de cada cromosoma eucariótico, lo que hablaría de una secuencia específica de origen distribuida en varios puntos de cada cromosoma (3,7,8). Si la distancia entre cada replicón está entre 100 a 200 kilobases, en un genoma de mamífero (haploide) debería de haber entre 20,000 a 30,000 secuencias de origen, y ésta secuencia podría ser un miembro de una familia de secuencias repetitivas. Sin embargo, el orden preferencial de iniciación en varios sitios implica una regulación, lo cual sugiere la presencia de señales únicas de origen en el DNA. Así por ejemplo, la heterocromatina representa un replicador tardío durante la fase S, aunque esto también podría considerarse como una consecuencia de su estructura más condensada, y no necesariamente como una asociación con un simple tipo de secuencia (3).

En el genoma mitocondrial y del virus SV40 existe un único origen de replicación (Figs. 4 y 5) de cerca de 75 pares de bases (7,9), y en el caso de éste último, se sabe que se requiere del antígeno T para que dé inicio la replicación de su DNA (7,9,10,11,12,13). Además, se sabe que ésta proteína también estimula la síntesis del DNA celular, aunque su preciso mecanismo de acción es aún desconocido (7,9,14,15). Adicionalmente, en el caso de Adenovirus se ha encontrado que una proteína de origen celular denominada factor nuclear 1 se une específicamente a su origen de replicación, y se cree, que la secuencia reconocida por éste factor en el DNA de Adenovirus -

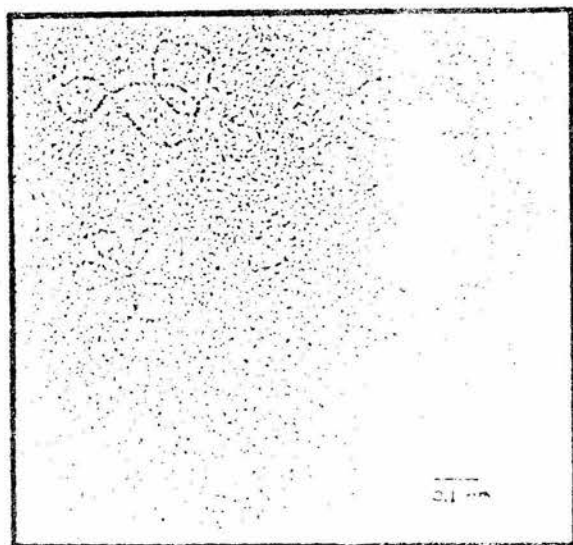
Fig. 3. DNA de SV40. a) Minicromosomas visualizados mediante la técnica de Dubochet (49), x 90,000. b) Minicromosoma en el cual se aprecia la región desprovista de nucleosomas ("gap"), y en la cual se encuentra el origen de replicación, x 180,000.- c) DNA de SV40 sin proteínas preparado según la técnica de -- Kleinschmidt (50), x 90,000. (Chavez P., Garcia A.).



a



b



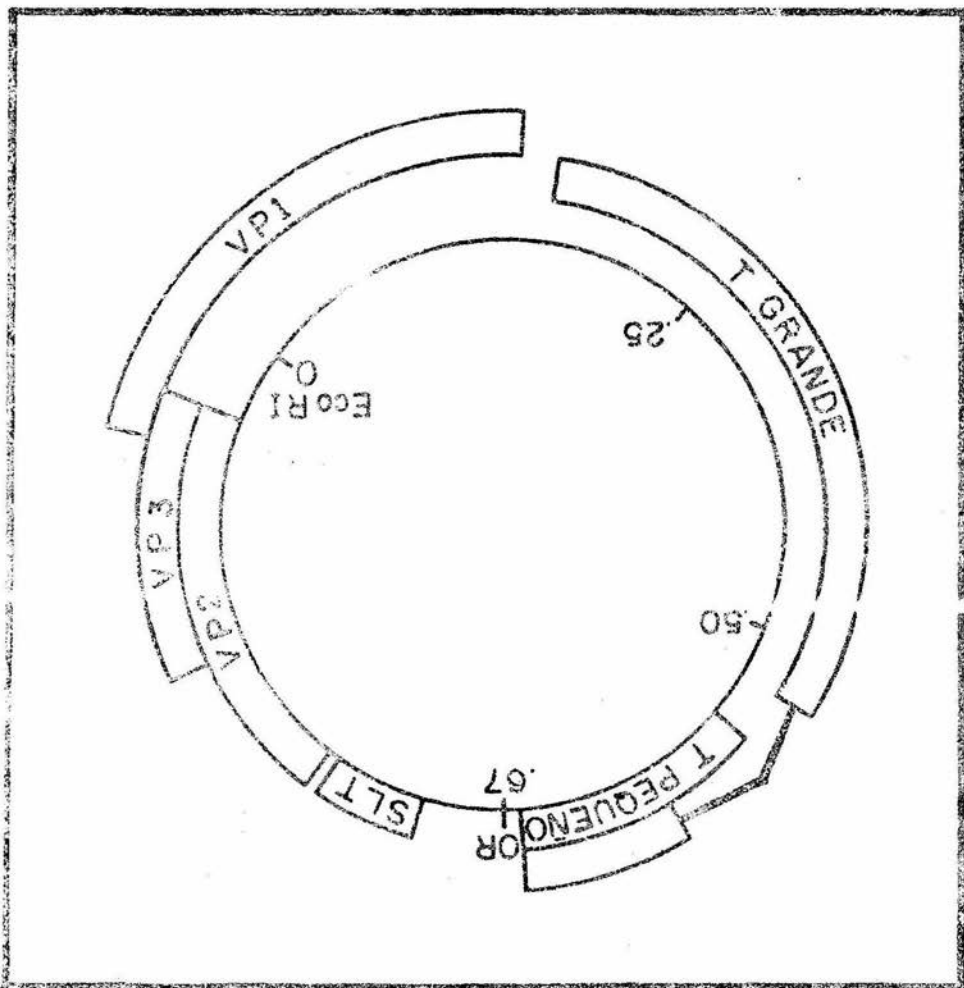
c

esté también presente en la célula (16).

Respecto a la síntesis del DNA, se ha encontrado que es bidireccional y de tipo semiconservativo (Fig. 2), quedando aún en debate si ésta procede de manera semidiscontinua (con fragmentos de Okazaki únicamente en uno de los brazos del tenedor de replicación), o si es totalmente discontinua (con fragmentos de Okazaki en ambos brazos del tenedor de replicación). Sobre los fragmentos de Okazaki, se ha demostrado que al igual que en procariotes, se requiere de la síntesis de un RNAPrimer para su formación (3,7).

En cuanto a las proteínas involucradas en la síntesis del DNA, las evidencias indican que la DNA polimerasa α es la enzima responsable de la iniciación y la elongación en la replicación de la cromatina celular y de los virus SV40 y Polioma (3,7,8,17,18,24), presentando una tasa de síntesis estimada (en mamíferos) en 1,000 a 3,000 pares de bases por minuto, y siendo éste un valor muy bajo en relación con la tasa de replicación del DNA bacteriano ($\approx 50,000$ pares de bases por minuto) (3,7,8). Sin embargo algunos aspectos como serían los de su peso molecular, su localización (nuclear o citoplasmica), y su acomplejamiento con otras proteínas durante la síntesis aún no han sido bien dilucidados (17). Una característica que llama la atención, es el hecho de que ésta enzima es prácticamente ubicua en la escala filogenética, conteniendo una subunidad catalítica que incluso se encuentra en la DNA polimerasa III de E. coli (17). Otra de las cosas que se han encontrado ultimamente es una correlación entre los diferentes niveles de ésta enzima, y la di-

Fig. 4. Mapa de SV40. Or, Origen de replicación. SLT, Secuencia líder tardía. VP1, VP2 y VP3, regiones que codifican para proteínas de la cápside. T, secuencias que codifican para los antígenos de transformación celular.



ferenciación celular (17).

La DNA polimerasa β en contraste, es una enzima ausente en procariotes y plantas, y ciertas evidencias indican que ésta polimerasa participa en procesos de reparación del DNA, aunque tal función también le ha sido atribuida a la DNA polimerasa α (17). Otra DNA polimerasa muy conservada entre los eucariotes es la γ , la cual se encarga de la replicación del DNA mitocondrial, pero que también ha sido encontrada en el núcleo con función aún desconocida. Su presencia nuclear fué detectada porque ahí realiza la replicación del DNA de Adenovirus (17). Así mismo se ha descrito la presencia de otra DNA polimerasa eucariótica (la δ) la cual es prácticamente similar en cuanto a sus características y función a la DNA polimerasa α (17).

Se han encontrado evidencias sobre la presencia de otras proteínas (Fig. 2) como son las proteínas desestabilizadoras de hélice (3,7,19), las topoisomerasas (3,25), las proteínas girasa y ligasa (7,25), y algunos otros factores necesarios para la replicación que no han podido ser caracterizados, pero que han sido detectados por su labilidad ante el calor (7,20). Así, la información de que se dispone sobre todas estas proteínas y factores (así como de las DNA polimerasas mencionadas), no provee de una satisfactoria explicación sobre el funcionamiento de los complejos de replicación y reparación del DNA dentro de la célula (17).

Con respecto al ensamblaje de las histonas con el DNA durante la replicación, aún existe debate en cuanto a que si éste

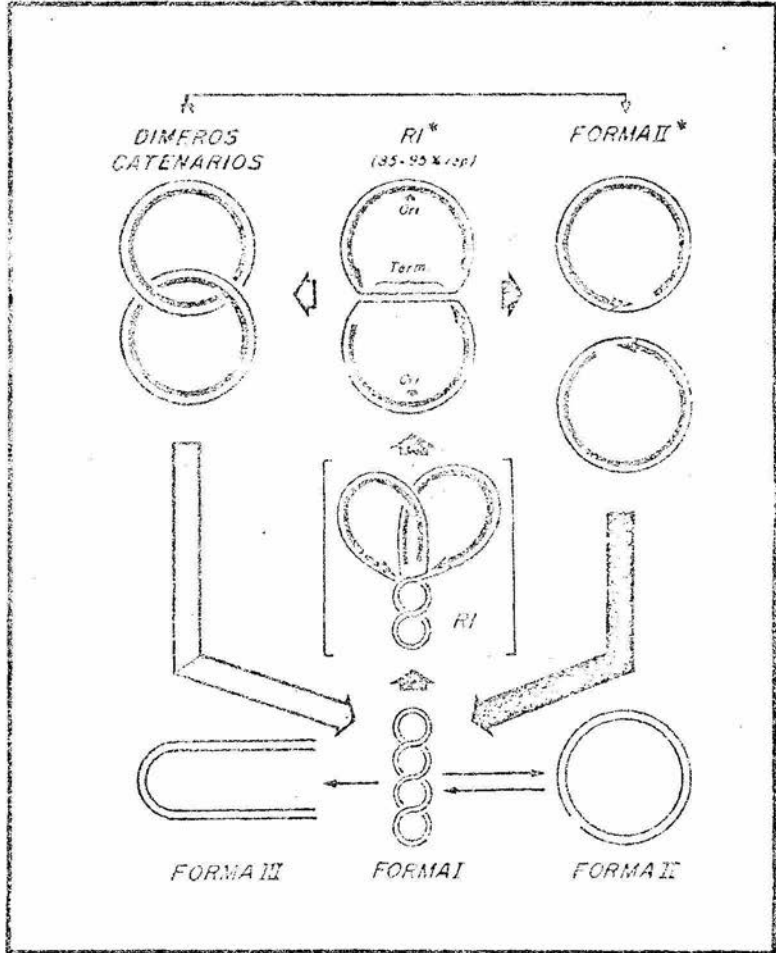
sucede al azar o de manera conservativa (3,7,14,21,22). No obstante, se ha comprobado que tal ensamblaje sucede de una forma muy rápida, y que existe una maduración de los nucleosomas -- (Fig. 2) reflejada en una modificación de las histonas (desacetilación) conforme procede la síntesis del DNA (7,23). También se ha visto que el ensamblaje de las histonas con el DNA puede ocurrir libremente y no necesariamente asociado con el acto de la replicación, siendo independiente de la secuencia nucleotídica en el DNA, y requiriendo de un factor al que se ha denominado nucleoplasmina (3,7). El mecanismo preciso de separación de las dos moléculas hijas al final de la replicación es aún desconocido (7).

AISLAMIENTO DE LA CROMATINA ACTIVA EN REPLICACION.

El primer paso que se debe de dar para poder estudiar la cromatina activa en replicación es purificarla.

Uno de los principales problemas que se presentan al intentar separar la cromatina activa en replicación en eucariotes es la carencia de una sincronía en el ciclo celular, y aún -- cuando se lograra resolver éste problema, durante la fase S la replicación se va dando a diferentes tiempos, con lo que siempre existirá una contaminación de la cromatina celular que no está replicando, sobre la que si lo está haciendo en un momento determinado (3,18). No obstante, se ha conseguido la purificación de algunas de las proteínas que forman parte del complejo de replicación (18), y con ellas se han realizado algunos estu

Fig. 5. Ciclo Replicativo de SV40. La replicación del DNA de SV40 procede de manera bidireccional a partir de su único replición, generandose varias regiones de DNA cadena sencilla. RI, intermediario replicativo. RI*, intermediario replicativo cercano a la terminación, el cual origina directamente forma II, o bien dímeros catenarios que por la acción de una enzima (la topoisomerasa) originan la forma I. Las formas superhelicoidal (I) y circular (II) son interconvertibles, y la forma lineal (III) se genera al haber un corte de las dos cadenas del DNA. Ori, origen de la replicación. Term., región donde termina la replicación y se separan las moléculas hijas (57).



dios in vitro.

En la mayoría de los estudios in vitro, como los realizados en células permeabilizadas de Saccharomyces cerevisiae, en extractos celulares de Chlamidomonas reinhartii, en extractos celulares con DNA de Adenovirus (18), y en extractos de Xenopus laevis con DNA de SV40 (18,27), se ha logrado restablecer la -- síntesis de DNA en cromosomas ya iniciados. Sin embargo la iniciación de la síntesis en los orígenes de los nuevos replicones, con algunas excepciones, aún no ha podido ser obtenida in vitro (3), y se han detectado ligeros cambios en el patrón normal de replicación del DNA en tales sistemas (7).

La purificación parcial de una fracción cromatínica activa en replicación conteniendo específicamente un replicón ha -- sido posible con el genoma de SV40 (28,29,30). En células infectadas líticamente, el DNA del SV40 se halla asociado con histonas formando un minicromosoma (9) (Fig. 3). En los estados tardíos de la infección, las secuencias virales son amplificadas -- 5×10^5 veces, estando solo entre el 2 al 5% activo en replicación , y un 1% activo en transcripción (3,9,31,32,53).

Los minicromosomas ofrecen las ventajas de ser una población homogénea de moléculas de DNA de doble cadena circular de tamaño pequeño (5,243 pares de bases), su secuencia de nucleótidos está bien establecida (Fig. 4) (33), posee un único replicón (7), su ciclo de replicación ha sido ya determinado (Fig. 5), y además presenta la facilidad de extraerlo bajo condiciones no -- desnaturizantes bajo las cuales se mantiene la estructura pri

maria de la cromatina (34).

Edenberg, et al.(1977) y Sundin & Varshavsky (1980) han descrito la semipurificación del complejo de replicación de -- SV40 bajo condiciones que no alteran la estructura de la cromatina (0.1M de NaCl). Ambos procedimientos utilizan el cambio en sedimentación en gradientes de sacarosa para separar los complejos de replicación del resto de los minicromosomas. Sin embargo es bien conocido que la separación que se logra mediante ésta técnica es parcial (7,18,28), existiendo una contaminación no solo de los minicromosomas maduros sobre los replicativos, sino también de DNA celular (18).

OBJETIVO DEL TRABAJO Y ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.

El objetivo del presente trabajo consiste en el desarrollo de un método de purificación de cromatina activa en replicación usando como modelo el minicromosoma activo en replicación de SV40 obtenido a partir de núcleos celulares en la etapa tardía de infección.

Para lograr el anterior objetivo, se va a experimentar una estrategia que consiste en el empleo de la proteína codificada por el gen 32 del bacteriófago T4 (P32), la cual presenta una gran afinidad por ácidos nucleicos de cadena sencilla (36, 37,38). Este hecho sugiere la posibilidad de permitir la purificación de los minicromosomas activos en replicación ya que se ha reportado la presencia de regiones desnudas de DNA de cadena

sencilla en los complejos de replicación de SV40 (29). Como primer paso, se asociaría la P32 a las regiones de DNA de cadena sencilla presentes en el complejo y posteriormente, mediante el empleo de anticuerpos dirigidos contra la P32, se intentaría la inmunoprecipitación de tales complejos de replicación (Fig. 10). Para lograr ésto, se deberán de cumplir los siguientes objetivos intermedios:

- 1.- Obtención y purificación de la proteína 32.
- 2.- Producción y purificación de anticuerpos de conejo dirigidos contra la proteína 32.
- 3.- Obtención y purificación de ácidos nucleicos diferencialmente marcados (^3H -DNA cadena sencilla y ^{14}C -DNA cadena doble).
- 4.- Aislamiento de cromatina de SV40 que ha sido marcada durante un tiempo largo de 16 horas con ^{14}C -Timidina, y durante un pulso de 5 minutos con ^3H -Timidina a partir de células CV1, y durante el período tardío de la infección.
- 5.- Establecimiento de las condiciones de la inmunoprecipitación (concentración de P32 y de anticuerpos, tiempo de reacción, temperatura óptima).

Los productos de la inmunoprecipitación se pueden valorar por la separación diferencial de marca radioactiva, es decir, - si recuperamos en el precipitado la marca incorporada durante el pulso de 5 minutos (^3H) y si a la vez ésta marca (y no así -

la de ^{14}C) desaparece del sobrenadante, nos indicaría que posiblemente estamos precipitando específicamente el complejo de replicación de SV40.

Una alternativa útil para asegurarse de la presencia de los complejos de replicación de SV40 en los precipitados obtenidos podría ser el empleo de electroforesis en geles de agarosa y de poliacrilamida-SDS.

M A T E R I A L Y M E T O D O S

A.- OBTENCION Y PURIFICACION DE PROTEINA 32 (39).

1.- Propagación del Bacteriófago T4.

Se creció un inóculo de 600 ml. de la bacteria E. coli - CR63 su⁺ en medio M9 por toda la noche a 37°C. Al día siguiente una fracción del inóculo se diluyó en 10 lt de M9 hasta obtener una absorbancia de 0.01 a 590 nm. Posteriormente la bacteria se creció a 37°C hasta obtener una lectura de 0.1-0.2 de absorbancia a 590 nm. Se le añadió en seguida al medio 40 mg/lt del aminoácido L-triptófano. Diez minutos después, las bacterias se infectaron con el bacteriófago T4 triple mutante (33⁻amNI34, 55⁻amBL292, y 58-61⁻amE219) adicionando un fago por cada 10 bacterias (moi = 0.1). El cultivo se incubó por 4 hr.; luego se adicionaron 2 ml de cloroformo y 35 µg de DNasa I por cada litro de cultivo. Se incubó nuevamente por 30 min. a 37°C y posteriormente se enfrió a 4°C. Después se centrifugó a 5,900 x g. (en una centrifuga de flujo continuo) por 10 min. a 4°C para eliminar restos celulares. Al sobrenadante se le agregó NaCl a una concentración final de 0.5 M y Polietilenglicol 6,000 al 10% final; se mezcló por 2 hr. a 4°C, centrifugandose después a 5,900 x g. por 10 min. a 4°C. La pastilla obtenida se resuspendió en 200 ml de amortiguador Tris-HCl 0.02 M pH: 7.4, 0.1 M NaCl, y se mezcló suavemente por 1 ó 2 días. Finalmente se centrifugó a 4,100 x g. por 10 min. a 4°C, para limpiar el fago de restos celulares. El fago se almacenó en refrigeración a 4°C, y se prepararon muestras para microscopía electrónica por --

la técnica de tinción negativa (48).

2.- Obtención de Bacterias E. coli B infectadas con Bacteriófago T4.

Se creció un inóculo de 600 ml de la bacteria E. coli B su⁻ (cepa no supresora de mutaciones ambar de bacteriófago T4) en medio M9 a 32°C por toda la noche. Al día siguiente una fracción del inóculo se diluyó en 10 lt de medio M9 hasta obtener una absorbancia de 0.1 a 590 nm. El cultivo se creció a 32°C hasta -- una absorbancia de 1.0 a 590 nm. (se tienen en ésta lectura 4-5 X 10⁸ células por ml. de cultivo). Aproximadamente de 3.5 a 4 hrs. después de que se inició el cultivo se obtuvo una absorbancia de 1; entonces se adicionaron 40 mg de L-triptófano por lt. de cultivo y se incubó por 10 min. Posteriormente se infectaron las bacterias con el bacteriófago T4 triple mutante adicionando 5 fagos por bacteria (moi = 5) y 5 min. después se agregó más fago (moi = 5). Se incubó el medio a 32°C por 1.5 hrs. y enseguida se enfrió a 4°C. Después el cultivo se centrifugó a 10,500 x g. (en una centrifuga de flujo continuo a temperatura ambiente) descartandose el sobrenadante. La pastilla obtenida se pesó en papel aluminio y se congeló en nitrógeno líquido. Finalmente la pastilla fué almacenada a -70°C.

3.- Purificación de Proteína 32.

Se mezclaron 60 g de bacterias E. coli B infectadas con el bacteriófago T4 con 180 ml de amortiguador L (40 mM Tris -- HCl pH:8.1, 0.1 M NaCl, 10 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM β-mercaptoetanol, 1 mM PMSF y 20 μg/ml de DNasa I) en una li cuadora a baja velocidad (8°C). Enseguida se centrifugó a 4,000

x g durante 3 min. a 4°C para eliminar espuma. Entonces se distribuyó la muestra en volúmenes de 100 ml y se sonicó en un sonicador Branson B-30 durante 3 intervalos de 3 min. al poder máximo del sonicador teniendo cuidado de que la temperatura no excediera de 15°C. Enseguida se incubó durante 30 min. a 15°C y se enfrió rápidamente a 4°C. Entonces se centrifugó a 23,500 x g durante 30 min. a 4°C para bajar restos celulares. Se tomó el sobrenadante y se ultracentrifugó a 90,000 x g durante 2 hrs. a 4°C para empastillar ribosomas. El sobrenadante se dializó contra 2 lt de amortiguador DC 0 (0.1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH:8.1, 5 mM EDTA, 1 mM β -mercaptoetanol) realizándose tres cambios durante 18 hrs. El dializado se centrifugó a 16,300 x g durante 5 min. a 4°C y al sobrenadante se le adicionó glicerol hasta una concentración final de 10%. Esta muestra se sometió a una cromatografía en una columna de DNA-celulosa (63 ml) previamente equilibrada con 90 ml de amortiguador DC 1 (0.1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH:8.1, 1 mM EDTA, 1 mM β -mercaptoetanol, 10% glicerol), eluyéndose sucesivamente (a un flujo de 40 ml/hr) con 90 ml de cada uno de los siguientes amortiguadores: DC 1, DC 2 (0.6 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH:8.1, 1 mM EDTA, 1 mM β -mercaptoetanol, 10% glicerol), y DC 3 (2 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH:8.1, 1 mM EDTA, 1 mM β -mercaptoetanol, 10% glicerol); y colectándose posteriormente fracciones de 6 ml. Se juntaron aquellas fracciones que eluyeron a 2 M de NaCl y tenían una absorbancia mayor de 1 a 280 nm. Esta muestra se dializó contra 2 lt de amortiguador B (20 mM Tris-HCl pH:8.1, 1 mM EDTA, 1 mM β -mercaptoetanol, 10% glicerol) realizándose 2 cambios durante 12 hrs. El dializado se sometió a una cromatografía en una columna de DEAE-Celulosa (30 ml) previamente equilibrada con 25 ml de amortiguador B, y

se eluyó la muestra (a un flujo de 20 ml/hr) con 150 ml de un gradiente lineal creciente de sal (de 0 a 0.5 M NaCl) el cual se formó con 75 ml de cada uno de los amortiguadores B, y B 0.5 (20 mM Tris-HCl pH:8.1, 1 mM EDTA, 1 mM β -mercaptoetanol, 10% glicerol, 0.5 M NaCl). Se colectaron fracciones de 6.5 ml y se reunieron aquellas fracciones que presentaban una absorbancia mayor de 1 a 280 nm. Esta muestra se dializó contra 2 lt de -- amortiguador PS 0 (0.1 M NaCl, 30 mM Tris-HCl pH:8.1, 1 mM -- β -mercaptoetanol, 10% glicerol) efectuandose 2 cambios de amortiguador durante 12 hrs. y éste dializado se mezcló con un -- volumen de amortiguador PS 2 (0.1 M NaCl, 30 mM Tris-HCl pH:8.1, 1 mM β -mercaptoetanol, 10% glicerol, 20 mM $MgCl_2$, 28% $(NH_4)_2 SO_4$). Entonces se sometió a una cromatografía en una columna de Fenil-Sefarosa (10 ml) previamente equilibrada con 15 ml de amortiguador PS 1 (0.1 M NaCl, 30 mM Tris-HCl pH:8.1, 1 mM -- β -mercaptoetanol, 10 mM $MgCl_2$, 10% glicerol, 14% $(NH_4)_2 SO_4$), lavandose enseguida la columna con 15 ml de amortiguador PS 1 (a un flujo de 14 ml/hr), y eluyendose posteriormente con 100 ml de un gradiente invertido lineal de 14 a 0% $(NH_4)_2 SO_4$, el cual se formó con 50 ml de cada uno de los amortiguadores PS 1 y PS 3 (0.1 M NaCl, 30 mM Tris-HCl pH:8.1, 1 mM β -mercaptoetanol, 10 mM $MgCl_2$, 10% glicerol); nuevamente se lavó la columna, pero ahora con 15 ml de amortiguador PS 3 con la finalidad de determinar la elución, colectandose fracciones de 3 ml. Se juntaron aquellas fracciones que presentaron una absorbancia mayor de 0.2 a 280 nm y se dializó primero contra 250 ml de amortiguador S 1 (0.1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH:8.1, 1 mM EDTA, 0.5 M DTT, 10% glicerol) realizandose 2 cambios durante 12 hrs.; y finalmente contra 250 ml de amortiguador S 2 (0.1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH:8.1, 1 mM EDTA, 0.5 M DTT, 62% glicerol) efec--

tuandose 2 cambios durante 12 hrs. Las alícuotas de 1 ml se almacenaron a -20°C , y se determinó su concentración por el método de Bradford (51).

E.- OBTENCION Y PURIFICACION DE ANTICUERPOS DE CONEJO CONTRA LA PROTEINA 32.

1.- Obtención y Preservación del Suero (40).

Para la obtención del suero se dispuso de 4 conejos machos New Zeland de aproximadamente 1.5 Kg, y a cada uno de los cuales se le inmunizó con 200 μg de proteína 32 y adyuvante de Freund completo (1:1). La primera inmunización de los conejos se realizó inyectándolos en los cojinetes de las patas traseras y en la parte dorsal. Las subsecuentes inmunizaciones (cada 15 días) se aplicaron simultáneamente por vía subcutánea en la parte dorsal, y por vía intramuscular en las patas traseras. El sangrado de los conejos se realizó cada 8 días después de la primera inmunización, y se fué observando la respuesta del conejo y el título de anticuerpos por medio del método de inmunodifusión (Öuchterlony) (40,42).

Después de sangrado el conejo, se dejó la sangre por 2 hrs. a 37°C para permitir la formación del coagulo. Entonces se separó el suero del coagulo cuidadosamente y se centrifugó a $1,000 \times g$ durante 30 min. a 4°C . Se tomó el sobrenadante cuidadosamente con una pipeta pastur con la punta justo debajo del menisco, y se almacenó a -20°C .

2.- Purificación de γ -Globulinas (40,41).

Todas las operaciones se realizaron a 4°C.

Se tomó un volumen de suero (20 ml) y se le adicionó un volumen de amortiguador boratos (0.1 M BO_3^{-3} , 25 mM $\text{Na}_2 \text{B}_4 \text{O}_7$ -pH: 8.4, 150 mM NaCl), agitándose lentamente por 15 min. Entonces se adicionó un volumen de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ (saturado a 4°C) lentamente (gota a gota) y agitando constantemente. Se dejó reposar por 6 hr. y en seguida se centrifugó a 1,200 x g durante 30 min. Se separó la pastilla y ésta se resuspendió en un pequeño volumen de amortiguador boratos (10 ml) (se guardó el sobrenadante para título); nuevamente se adicionó un volumen de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ lentamente y agitando constantemente y se centrifugó a 1,200 x g. durante 30 min. Se tomó la pastilla (guardándose el sobrenadante para título) y se resuspendió en un pequeño volumen (5 ml) de amortiguador PBS (0.1 M PO_4^{-3} pH: 7.2, - 150 mM NaCl). Se dializó contra un litro de amortiguador PBS - (6 cambios durante 72 hrs.), y el dializado se pasó por una columna doble que contenía 30 ml de CM-Celulosa sobre 30 ml de DEAE-Celulosa, equilibrada con amortiguador PBS. Se colectaron fracciones (velocidad de flujo de 40 ml/hr) de 10 ml, concluyéndose la colección de las γ -globulinas con 90 ml de amortiguador PBS. Se juntaron aquellas fracciones que presentaron una absorbancia mayor de 1 a 280 nm y se almacenaron alícuotas de 1 ml a -20°C. La concentración de proteína en las alícuotas - fué determinada por el método de Bradford (51).

C.- OBTENCION Y PURIFICACION DE DNA CELULAR.

1.- Cultivo de Células (30,31).

Las células CV1 (línea establecida a partir de células de riñón de mono verde africano) se cultivaron en monocapa en medio Eagle modificado por Dulbecco y suplementado con suero fetal de ternera al 10%. Los cultivos se mantuvieron en incubación a 37°C y en presencia de CO₂ al 7%. Para los pasajes de mantenimiento, las células fueron sembradas en frascos de 75 cm² a una densidad de 5 X 10⁶ células contenidas en 20 ml de medio con -- suero.

2.- Marcaje y Extracción de DNA Celular (31,44).

Las células CV1 fueron sembradas en cajas de petri (p--- 100) a una densidad de 3 X 10⁶ células en 10 ml de medio suplementado con suero al 10%. 72 hrs. después se realizó un cambio por medio fresco, y 24 hrs. después de esto se retiraron 5 ml de medio a cada caja, adicionandose enseguida 2.5 μ Ci de ¹⁴C-- Timidina o 25 μ Ci de ³H-Timidina por caja. Se incubó por 16 hrs. a 37°C en presencia de CO₂ y entonces se lavaron las células 2 veces con 2.5 ml de amortiguador PBS (100 mM PO₄⁻³ pH:7.2, 150- mM NaCl). Enseguida se añadió a cada caja 2.5 ml de solución -- Hirt (10 mM Tris-HCl pH:7.9, 10 mM EDTA, 0.6% SDS) y se les mantuvo así a las células por 20 min. a temperatura ambiente. El gel liquido que se forma fué raspado cuidadosamente (con un gen darme de hule) y se virtió en un tubo ajustandose a una concentración final de 1 M NaCl. Esta muestra se mantuvo a 4°C por 16 hrs. y se centrifugó a 7,700 x g durante 1 hr. a 4°C. En el precipitado se encontraba el DNA celular el cual fué almacenado a 4°C.

3.- Purificación y Desnaturalización del DNA (43).

El precipitado obtenido anteriormente que contenía el DNA celular fué disuelto en un volumen de amortiguador TE (10 mM Tris-HCl pH:7.9, 1 mM EDTA) y enseguida se mezcló con un volumen de fenol saturado con TE. Se agitó lentamente durante 3-min. a temperatura ambiente y se centrifugó a 480 x g por 15 - min. a 4°C. Se separó la fase acuosa superior que contenía al DNA y a ésta se le realizó una segunda extracción fenólica -- obteniéndose nuevamente una fase acuosa a la cual se le agregó un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Se agitó - varias veces durante 1 min. y se separó la fase acuosa superior que contenía al DNA. A ésta fase se le realizó una segunda extracción con cloroformo:alcohol isoamílico, y a la fase acuosa resultante se le agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto frío. Se dejó ésta muestra durante toda la noche a -20°C y al día siguiente se centrifugó a 12,000 x g durante 1 hr a -5°C. Se descartó el sobrenadante mientras que a la pastilla obtenida se le resuspendió en el menor volumen posible de amortiguador TE. Entonces el DNA se rompió en fragmentos de tamaño variable mediante la aplicación de 14 golpes a máxima presión con una jeringa hipodérmica, y el DNA marcado con ^{14}C se almacenó en -- alícuotas de 100 μl a -20°C. En el caso del DNA marcado con ^3H , éste se calentó a 100°C por 15 min. y se enfrió rápidamente en un baño de hielo a 0°C (desnaturalización). Finalmente también se almacenó en alícuotas de 100 μl a -20°C. La concentración de DNA fué determinada por la lectura de la absorbancia de una alícuota (dilución 1:10) a 260 nm.

4.- Ensayo de Precipitación de DNA de cadena sencilla (52).

Se utilizó una cantidad constante de DNA ($1 \mu\text{g}$) tanto de cadena doble (marcado con ^{14}C), como de cadena sencilla (marcado con ^3H) y el volumen final de cada ensayo se ajustó a $400 \mu\text{l}$ con amortiguador TE. Se varió la cantidad de proteína 32 desde 0 hasta $3 \mu\text{g}$ incubándose durante 1 hr. a 4°C . Después se adicionó una cantidad constante de anticuerpos ($150 \mu\text{g}$) contra la proteína 32 y se incubó durante 1 hr. a 4°C . Enseguida se adicionaron a cada ensayo $15 \mu\text{g}$ de proteína A y nuevamente se incubó durante 1 hr. a 4°C . Se centrifugó durante 5 min. a $12,000 \times g$ (en centrifuga eppendorf) y se separó el sobrenadante de la pastilla, la cual se resuspendió en $100 \mu\text{l}$ de amortiguador TE. Tanto al sobrenadante como a la pastilla se les trató con álcali (0.6 N NaOH) durante toda la noche para evitar el encubrimiento de la radioactividad por las proteínas, y al día siguiente se neutralizó con HCl . Después se colocó al sobrenadante y a la pastilla por separado sobre papel Whatman 3MM y se lavó a los papeles 5 veces (períodos de 5 min.) a 4°C con TCA al 5%, y 2 veces con etanol al 96%. Enseguida los papeles se secaron y se colocaron en viales que contenían 5 ml de líquido de centelleo ($1.25\% \text{ PPO}$, $0.04\% \text{ POPOP}$, disueltos en tolueno) para la posterior evaluación de su radioactividad en un contador de centelleo.

D.- AISLAMIENTO E INMUNOPRECIPITACION DE CROMATINA DE SV40.

1.- Propagación del Virus SV40 (30,31).

Para infectar con el virus SV40 (cepa 777) las células CV1 fueron sembradas en cajas de petri (p-100) a una densidad -

de 3×10^6 células en 10 ml de medio Eagle modificado por Dulbecco y suplementado con suero al 10%. 72 hrs. después (tiempo en que las células alcanzan una densidad de 7×10^6 células por caja), cada caja se lavó 2 veces con solución PBS (100 mM PO_4^{-3} - pH:7.2, 150 mM NaCl) y enseguida se infectó con el virus SV40 a una moi de 10^{-2} PFU en un volumen de 0.5 ml/caja de medio sin suero. Se permitió la adhesión del virus durante 90 min. a 37°C con movimientos periódicos y posteriormente se adicionó a cada caja 10 ml de medio suplementado con 2% de suero. Las células infectadas fueron mantenidas en incubación a 37°C en presencia de 7% CO_2 durante 12 días, tiempo en que se pudo observar el efecto citopático. Entonces el contenido de las cajas fué vertido en una botella (después de raspar el fondo de cada caja con un gendarme de hule), y enseguida se centrifugó a 10,000 x g durante 30 min. a 4°C . El sobrenadante que contenía a los virus se guardó mientras que a la pastilla se le resuspendió en el mínimo volumen de PBS, para después darle 3 ciclos de congelación - descongelación en una mezcla de etanol - hielo seco. La muestra resultante se centrifugó bajo las condiciones anteriormente descritas y se juntaron los sobrenadantes obtenidos de ambas centrifugaciones. La mezcla se ultracentrifugó a 112,000 x g durante 4 hrs. a 4°C y la pastilla obtenida que contenía el virus se resuspendió en medio con 1% de suero. Se almacenaron alícuotas de 1 ml a -20°C , y se prepararon muestras de microscopía electrónica por la técnica de tinción negativa (48) para la visualización de los viriones.

2.- Marcaje y Extracción de Complejos Nucleoproteicos de SV40 (30).

Las células CV1 fueron sembradas en cajas de petri (p-100)

a una densidad de 3×10^6 células en 10 ml de medio Eagle modificado por Dulbecco y suplementado con 10% de suero. 72 hrs. -- después cada caja se lavó 2 veces con amortiguador PBS y se infectó con el virus SV40 a una moi de 10 PFU procediéndose como está descrito anteriormente. Al momento en que concluyen los 90 minutos de adhesión, se le considera como el tiempo 0 de la infección adicionandosele a cada caja 10 ml de medio suplementado con 2% de suero. Las células infectadas se mantuvieron a 37°C - en presencia de 7% CO₂ y a las 24 horas post-infección (h.p.i.) se adicionaron 2.5 µCi/caja de ¹⁴C-Timidina (después de haber retirado 5 ml de medio por caja). A las 40 h.p.i. las células se lavaron 2 veces con PBS y se adicionó a cada caja 2 ml de medio suplementado con suero al 2% y conteniendo 200 µCi de ³H-Timidina. Se incubó durante 5 min. (pulso) a 37°C en presencia de CO₂ y se paró el marcaje de pulso retirando rápidamente el medio y lavando a las células 2 veces con 2.5 ml de amortiguador I -- (1 mM TrisHCl pH:6.8, 140 mM NaCl) frío. Se colocaron rápidamente a las cajas sobre hielo.

A cada caja se le adicionaron 2 ml de amortiguador II -- (10 mM TEA-HCl pH:6.8, 10 mM EDTA, 1 mM PMSF, 0.25% Tritón x-100) y se mantuvo así a las células durante 10 min. a 4°C. Se ajustó a una concentración final de NaCl de 120 mM y el lisado celular se raspó con un gendarme de hule centrifugandose enseguida a 5,000 x g durante 5 min. a 4°C. La pastilla obtenida se resuspendió en 20 ml de amortiguador III (10 mM TEA-HCl pH:6.8, 120 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.1 mM PMSF, 0.25% Tritón x-100) y se centrifugó bajo las condiciones anteriormente descritas obteniéndose una pastilla de núcleos, la cual se resuspendió en 1-ml de amortiguador IV (10 mM TEA-HCl pH:8, 120 mM NaCl, 10 mM -

EDTA, 0.1 mM PMSF, 0.25% Tritón x-100), incubándose en agitación durante 3 hr. a 4°C para la extracción de minicromosomas de SV40. Posteriormente se centrifugó durante 15 min. bajo las condiciones ya mencionadas y el sobrenadante (cromatina viral) se colocó sobre un gradiente líneal de 5-25% de sacarosa disuelta en amortiguador V (10 mM TEA-HCl pH: 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA), con un colchon de sacarosa al 40% (1ml). El gradiente se ultracentrifugó a 230,000 x g durante 150 min. a 4°C, y se colectaron 35 fracciones de 340 µl cada una. Se tomaron 20 µl de cada fracción y se colocaron sobre papel Whattman 3MM lavándose por 5 veces (5 min. por cada una) con TCA al 5%, y dos veces con etanol al 96%. Los papeles se secaron y se colocaron en viales que contenían 5 ml de líquido de centelleo, evaluándose su radioactividad en un contador para líquido de centelleo. Una vez obtenido el perfil de sedimentación de los minicromosomas en el gradiente, se reunieron por separado aquellas fracciones enriquecidas en marca de ³H (complejo replicativo parcialmente purificado, P1) y marca de ¹⁴C (complejo maduro, P2), para la posterior realización de los ensayos de inmunoprecipitación con la proteína 32 y los anticuerpos.

3.- Cuantificación de cromatina de SV40 (43).

Inicialmente se cuantificó el DNA por la técnica de la Difenilamina (45). Sin embargo posteriormente se prefirió el uso del método de agarosa en placa (43), dado que éste es un método rápido que detecta cantidades que no pueden ser cuantificadas espectrofotométricamente.

Las muestras de DNA (10 µl) fueron colocadas sobre la superficie de una placa de agarosa (en caja de petri) al 1% conteniendo 0.5 µg/ml de bromuro de etidio. Se colocaron también -

muestras (10 μ l) con una concentración de DNA ya conocida. Se permitió la difusión y se observó la placa en un transiluminador de luz ultravioleta de onda corta tomándosele una fotografía.

4.- Ensayo de Immunoprecipitación de Cromatina de SV40.

Se usó una cantidad constante de complejo replicativo - parcialmente purificado (P1) o de complejo maduro (P2), variándose la cantidad de proteína 32 o de anticuerpos dependiendo del ensayo. Se incubó durante 1 hr a 4°C con la proteína 32 y durante otra hr a la misma temperatura con los anticuerpos. En seguida se centrifugó a 12,000 x g durante 15 min. y se separó el sobrenadante de la pastilla la cual se resuspendió en 100 μ l de amortiguador A25 (50 mM Tris-HCl pH:7.9, 0.1 mM EDTA, 0.2 mM DTT, 25% glicerol). Tanto el sobrenadante como el precipitado - fueron tratados con 0.6 N de NaOH durante toda la noche y se neutralizaron con HCl al día siguiente. Las muestras resultantes - fueron colocadas sobre papel Whattman 3MM y se lavaron 5 veces (de 5 min. cada una) con TCA al 5%, y dos veces con etanol al - 96%. En seguida los papeles se secaron y colocaron en viales que contenían 5 ml de líquido de centelleo para la posterior evaluación de su radioactividad en un contador de centelleo.

E.- ANALISIS ELECTROFORETICO DE CROMATINA DE SV40.

1.- Electroforesis en Gel de Agarosa (30).

Se prepararon 130 ml de solución de agarosa al 1% en amortiguador acetatos (40 mM Tris-Acetatos pH:7.9, 20 mM Acetato de

Sodio, 1 mM EDTA) disolviendola por calentamiento. Se permitió que la solución se enfriara hasta 50°C y se le adicionó bromuro de etidio a una concentración de 1 µg/ml. Esta solución se vació en una cámara de electroforesis horizontal, a la cual se le había colocado un peine para formar 11 carriles con un volumen de 80 µl/carril. Una vez que solidificó la agarosa, se retiró el peine y se adicionó amortiguador de acetatos a la cámara hasta cubrir completamente el gel. Enseguida se preparó a las muestras adicionándoles SDS al 0.1%, Azul de Bromofenol al 0.01% y glicerol al 15% (en caso de que la muestra careciera de sacarosa). Posteriormente se calentó éstas muestras en baño maría por 5 min. a 65°C y se les colocó sobre los carriles del gel. La migración se llevó a cabo durante 14 hrs. a 35 volts, 200 mA, recirculando el amortiguador a temperatura ambiente. - Una vez finalizada la migración, el gel se observó en un transiluminador con luz ultravioleta de onda corta.

2.- Fluorografía y Autorradiografía (30).

El gel se sumergió en metanol y se mantuvo durante 30 min. en agitación a temperatura ambiente. Enseguida se trasladó a un baño de solución metanol - 10% PFO, en la cual permaneció por tres hrs. en agitación. Posteriormente se eliminó el exceso de PFO con metanol y guantes, y se permitió al PFO precipitar, sumergiendo al gel en agua durante 30 min. en agitación. Después se colocó al gel sobre papel Whatman y se deshidrató en un secador de geles bajo presión reducida. Las primeras 2 hrs. fueron sin calor mientras que la última hora y media fué con calor. Una vez desecado el gel, éste se colocó junto con una película para autorradiografía en un cassette a -70°C.

3.- Electroforesis en Gel de Poliacrilamida-SDS (46).

Para formar el gel en gradiente, se utilizó una solución de acrilamida al 17% (0.37 M Tris-HCl pH:8.8, 0.1% SDS, 17% -- Acrilamida:bis acrilamida [30:0.8], 0.04% TEMED, 0.01% APS, 17% glicerol) y una solución al 5% (0.37 M Tris-HCl pH:8.8, 0.1% -- SDS, 5% Acrilamida : bis acrilamida [30:0.8], 0.04% TEMED, --- 0.01% APS, 5% glicerol). Se permitió que el gel solidificara durante 1 hr., y entonces se colocó un peine de 10 carriles con un volumen de 100 μ l/carril. Se agregó una solución para formar el gel concentrador (0.125 M Tris-HCl pH: 6.8, 0.1% SDS, 2.8 % Acrilamida : bis acrilamida [30:0.8], 0.04% TEMED, 0.05% APS, - 2.8% glicerol) y nuevamente se permitió que el gel concentrador solidificara durante 30 min. Entonces se retiró el peine y se - adicionó enseguida las muestras. Las muestras se prepararon -- ajustandose a una concentración final de 70 mM Tris-HCl pH:6.8, 0.7 mM β -mercaptoetanol, 2.2% SDS, 0.01% Azul de Bromofenol, y calentandose en baño maría durante 3 min. a 70°C. La migración- se llevó a cabo con solución de corrida (25 mM Trizma base, 190 mM Glicina, 0.1% SDS) en una cámara de electroforesis vertical- a 60 volts durante 14 hrs.

4.- Tincion con Nitrato de Plata (46).

Finalizada la migración , se colocó al gel en una solu-- ción de metanol al 50% durante 24 hrs. Después se lavó 2 veces- el gel con agua durante 30 min., y se dejó otras 2 hrs. en meta- nol al 50%. Se prepararon 21 ml de una solución de NaOH 87 mM a la cual se le adicionaron 1.25 ml de Hidróxido de Amónio concen- trado. Esta solución se mezcló con 4 ml de solución de Nitrato- de Plata al 20% y se ajustó a un volumen final de 100 ml con --

agua (en agitación fuerte), para constituir a la solución de tinción. Inseguida se enjuagó una vez con agua al gel y se le agregó la solución de tinción manteniéndose en agitación leve durante 20 min. de manera que se cubriera totalmente al gel con la solución. Una vez transcurrido éste tiempo, se retiró la solución de tinción del gel y éste se enjuagó con agua durante 5 min. Posteriormente se retiró el agua y se adicionó solución reveladora (0.005% Acido Cítrico, 0.01% Formaldehído) en la cual permaneció el gel hasta que se observaron las bandas de proteína. Para parar la reacción y fijar el gel se utilizó solución de Acido Acético al 1%.

R E S U L T A D O S

1.- Obtención de Proteína 32.

Para la obtención de la proteína 32 se requirió en primera instancia de la propagación del bacteriófago T4 para poder infectar a las bacterias E. coli B, productoras de ésta proteína

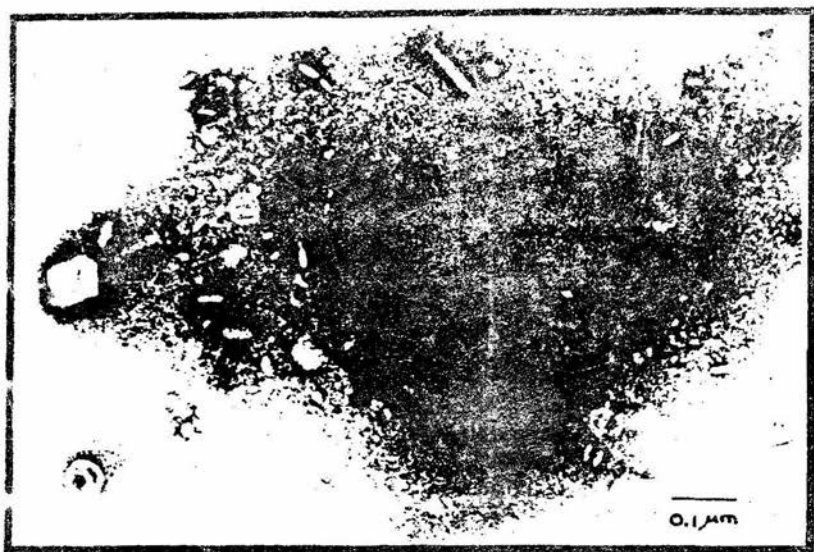
En la obtención del bacteriófago T4 triple mutante, primero se realizó una propagación a baja escala (9 lt) a partir de la cual se obtuvieron 100 ml de una solución que contenía 6.4×10^{10} fagos/ml. Con ésta solución se realizó una propagación a gran escala (60 lt), de la que finalmente se obtuvieron 800 ml de una solución con 2.3×10^{11} fagos/ml. Una muestra de los bacteriófagos obtenidos fué preparada para su visualización al microscopio electrónico (Fig. 6a).

Con esa cantidad de bacteriófagos obtenida era más que suficiente para realizar la infección de un cultivo a gran escala de la bacteria que produciría a la proteína 32 (E. coli B). Entonces a partir de un cultivo de 30 lt crecido hasta 1 D.O. (590 mm), e infectado a una moi de 10, se obtuvieron posteriormente 80 g (peso húmedo) de bacterias E. coli B infectadas con el bacteriófago T4.

Para la obtención de la proteína 32 se utilizaron 60 g de bacterias E. coli B infectadas con el bacteriófago T4, y el perfil de elución de las tres columnas utilizadas durante su pu

Fig. 6. a) El bacteriófago T4 triple mutante, X 100,000.
b) Virus SV40, X 120,000. Ambas preparaciones realizadas mediante el procedimiento de tinción negativa (48). (Miranda, E., Chavez P., Garcia A.).

a



b



rificación se muestra en la Fig. 7. En el caso de la columna de DNA-Celulosa, el pico de las fracciones 17-19 que eluyeron a -- 2 M de NaCl es el que corresponde a la proteína 32. Posteriormente ésta muestra en la cromatografía de DEAE-Celulosa se descompuso en varios picos de proteínas contaminantes (fracciones 2-10), y un pico mayoritario (fracciones 14-16) que contenía a la proteína 32. Finalmente la muestra proteica contenida en -- éste pico, al pasarse por la columna de Fenil-Sefarosa se disoció en dos picos, uno de los cuales contenía una proteína contaminante (fracciones 9-11), y el otro (fracciones 18-20, Fig.- 7c) contenía a la proteína 32 altamente pura.

A partir de 60 g de bacterias E. coli B infectadas se -- obtuvieron 96 mg de proteína 32.

2.- Obtencion de Anticuerpos de Conejo Contra la Proteína 32.

Los conejos New Zeland fueron inmunizados con la proteína 32, y cuando se detectó en ellos un incremento en el título de anticuerpos contra ésta proteína, se les desangró periódicamente hasta obtener 122 ml de suero.

A partir del suero obtenido, se realizó la purificación de las γ -globulinas primero con Sulfato de Amonio, y despues -- mediante una cromatografía en una columna de CM-Celulosa sobre DEAE-Celulosa, de la que se muestra el perfil de elución en la Fig. 8. Las proteínas que salen en el volumen de exclusión -- (fracciones 4-12) corresponden a las γ -globulinas mientras que

Fig. 7. Perfil de Elución de la Proteína 32. La proteína 32 se purificó parcialmente a partir de células E. coli B infectadas con el bacteriófago T4 (ver Material y Métodos). Después la proteína se pasó por tres columnas de las cuales se muestra el perfil de elución. a) DNA-Celulosa, la P32 eluyó a 2 M de NaCl -- (fracciones 17-19). b) DEAE-Celulosa, la P32 eluyó a 0.35 M de NaCl (fracciones 14-16). c) Fenil Sefarosa, la P32 eluyó a 0% de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ (fracciones 18-20).

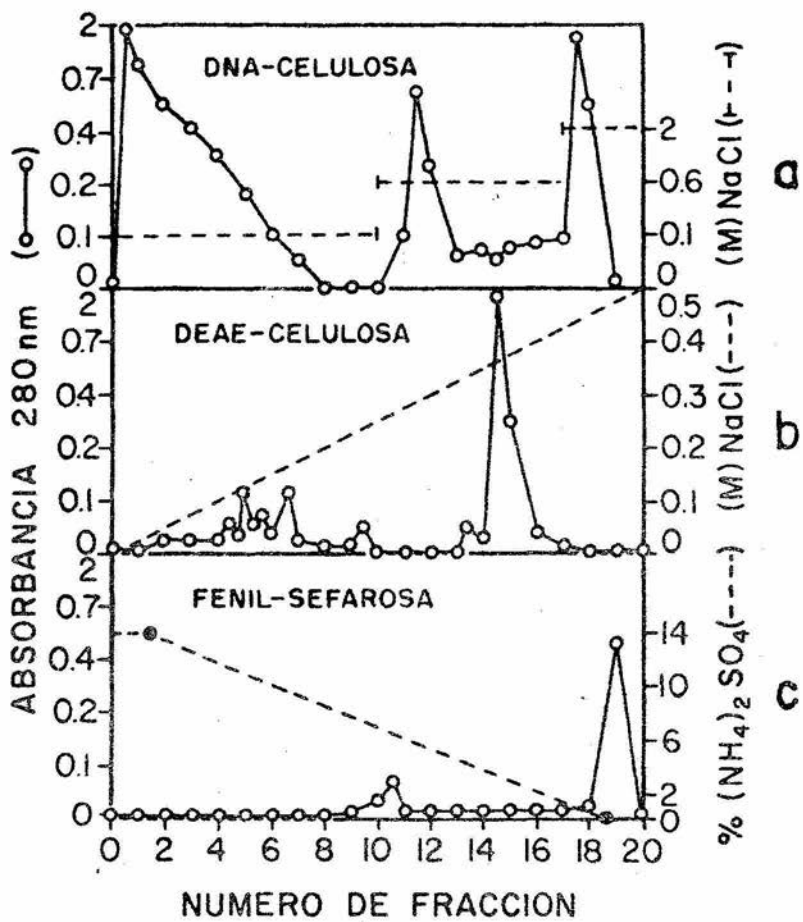
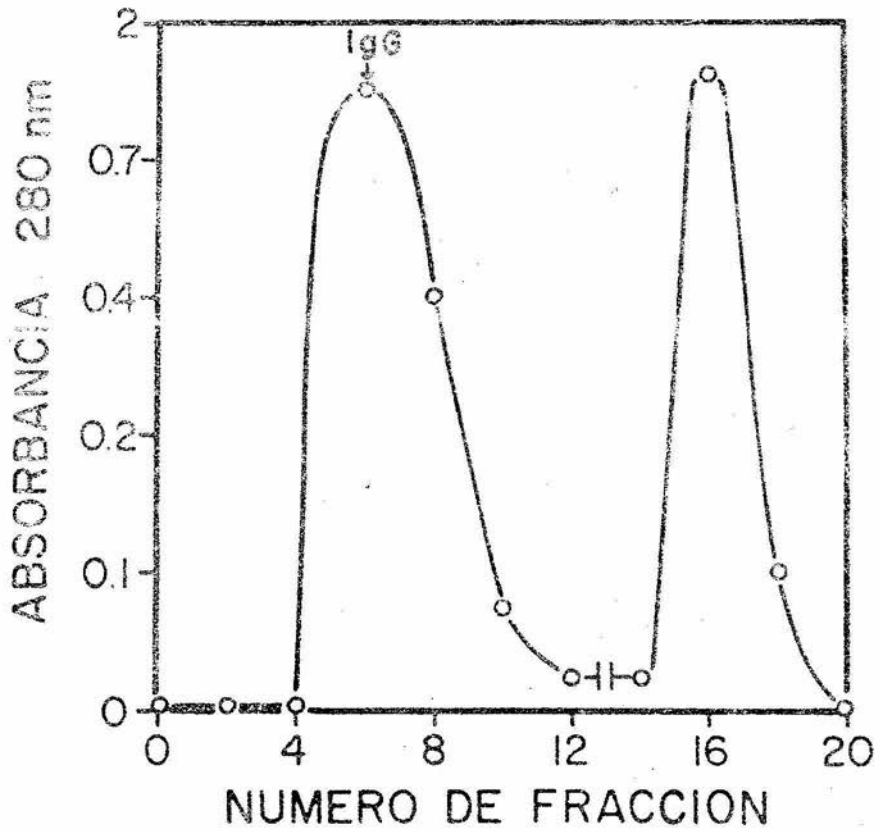


Fig. 8. Purificación de Anticuerpos contra la Proteína 32. Los anticuerpos se purificaron parcialmente mediante fraccionamiento con Sulfato de Amonio (ver Material y Métodos). La purificación total se logró mediante el uso de una cromatografía en una columna de CM-Celulosa sobre DEAE-Celulosa, de la cual se muestra el perfil de elución. El primer pico corresponde a las γ -globulinas (fracciones 4-10) que se obtienen en el volumen de exclusión. El segundo pico (fracciones 15-18) corresponde a -- otras proteínas del suero que salen despues de aplicar 1 M de NaCl a la columna.



Las proteínas que se eluyen después de aplicar 1 M de NaCl a la columna (fracciones 14-20) corresponden a otras proteínas del suero.

A partir de 122 ml de suero se obtuvieron 470 mg de anticuerpos contra la proteína 32.

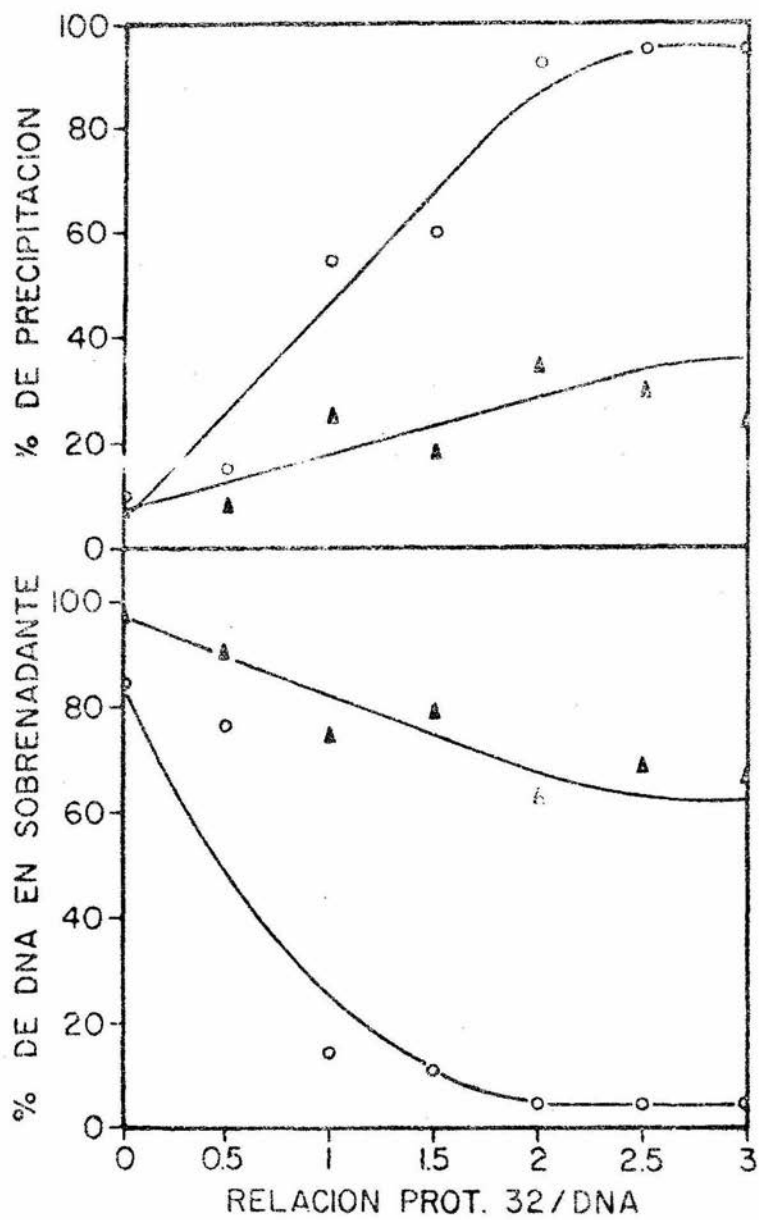
3.- Obtención de DNA Celular.

Para la extracción del DNA celular, se marcó a las células CV1 con ^3H -Timidina o ^{14}C -Timidina, y finalmente se purificaron (ver Material y Métodos) 280 μg de ^3H -DNA cadena sencilla y 300 μg de ^{14}C -DNA cadena doble. La cuantificación de estas muestras se realizó mediante la lectura de su absorbancia a 260 nm.

4.- Immunoprecipitación Indirecta de DNA de Cadena Sencilla.

Una vez obtenida la proteína 32, los anticuerpos, y el DNA celular, se procedió a evaluar la capacidad del sistema proteína 32 - anticuerpos para precipitar DNA de cadena sencilla. Para ello se mezcló 1 μg de ^3H -DNA cadena sencilla con 1 μg de ^{14}C -DNA cadena doble y se incubó a la mezcla con diferentes concentraciones de proteína 32. Posteriormente se adicionaron los anticuerpos contra la P32 y se centrifugó bajo las condiciones descritas en Material y Métodos. En la Fig. 9 se muestra el resultado obtenido después de la evaluación de la

Fig. 9. Immunoprecipitación Indirecta de DNA de Cadena Senci -
lla. Una concentración constante ($1 \mu\text{g}$) de ^3H -DNA cadena sencilla se incubó con diferentes concentraciones de P32 durante 1 -
hr. a 4°C en presencia de ^{14}C -DNA cadena doble ($1 \mu\text{g}$). Despues-
se incubó con una concentración constante de anticuerpos ($150 -$
 μg) durante 1 hr. a 4°C y con proteína A ($15 \mu\text{g}$) bajo las mis -
mas condiciones. Se centrifugó y se evaluó la radioactividad en
el precipitado (a) y el sobrenadante (b) mediante el uso de un
contador de centelleo. (O—O) ^3H -DNA cadena sencilla. (▲—▲)
 ^{14}C -DNA cadena doble.



a

b

radioactividad en el precipitado y el sobrenadante. Como puede observarse, con una proporción de proteína 32 : DNA de 2:1 (en relación al DNA de cadena sencilla) es suficiente para precipitar de 90-95% de DNA de cadena sencilla, mientras que para el DNA de cadena doble se precipitó no más de 30-35%. Cuando no se adicionó proteína 32 al sistema (relación P32/DNA = 0), el porcentaje de precipitación tanto para el DNA de cadena sencilla como para el DNA de cadena doble fué de 10-15%.

También se probó la capacidad de la P32 para precipitar por sí sola DNA de cadena sencilla, y lo que se encontró fué que no precipitaba más de un 10% para los dos tipos de DNA. Un resultado similar fué obtenido al centrifugar los ácidos nucleicos sin adicionar nada.

Con todo esto se vió que la P32 y los anticuerpos poseían la suficiente actividad para precipitar DNA de cadena sencilla, y además que el sistema era altamente específico.

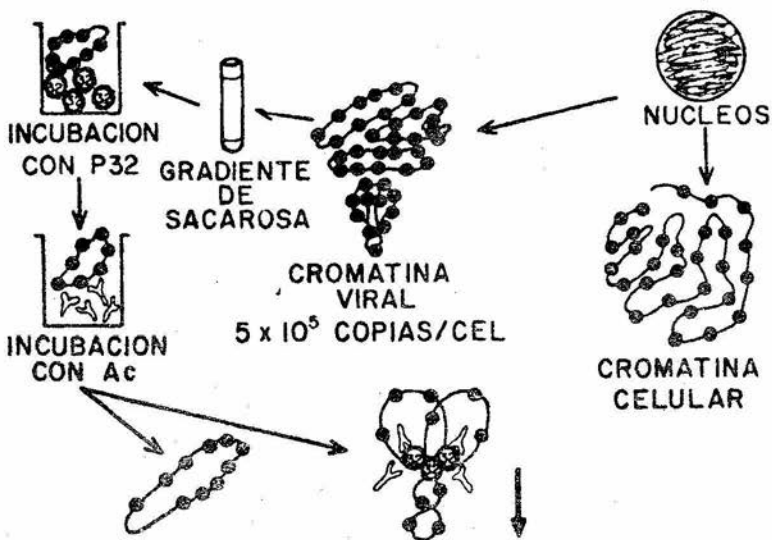
5.- Immunoprecipitación Indirecta y Análisis Preliminar de Cromatina de SV40 Activa en Replicación.

Para la immunoprecipitación de cromatina de SV40 activa en replicación, el primer paso que se dió fué el de la separación de la cromatina viral de la celular, y la forma de como se realizó esto así como el marcaje doble (^3H y ^{14}C) de la cromatina se encuentra esquematizado en la Fig. 10. Los detalles de la extracción se pueden ver en Material y Métodos.

Fig. 10. Esquema de Immunoprecipitación Indirecta de Complejos Replicativos de SV40. La marca de ^3H es incorporada únicamente por aquellas moléculas de DNA que están replicando en el momento que se dá el pulso de 5 min. Después de separar la cromatina celular, la cromatina viral activa en replicación es parcialmente purificada en un gradiente de sacarosa. La estrategia para lograr la purificación total sería el uso de la proteína 32 y anticuerpos contra ésta proteína.



5 min.



PRECIPITACION EN
COMPLEJOS REPLICATIVOS

La cromatina viral obtenida (marcada durante un tiempo - largo de 16 hrs. con ^{14}C -Timidina, y durante un pulso de 5 min. con ^3H -Timidina) fué sedimentada en un gradiente de sacarosa - (Fig. 10), con la finalidad de lograr la separación parcial de la cromatina activa en replicación.

En la Fig. 11 puede observarse el perfil de sedimentación de la cromatina de SV40 en el gradiente de sacarosa. La cromatina viral marcada principalmente con ^3H (fracciones 8-11) y que - representa a la cromatina activa en replicación, migra ligera - mente el fondo (90 S) en relación con la cromatina que ya termi - nó de replicar (75 S) la cual se encuentra principalmente marca - da con ^{14}C (fracciones 12-15) y representa aproximadamente el 95% de la cromatina total.

Después de reunir las fracciones ricas en marca de ^3H - (P1, Fig. 11), las cuales representan al complejo replicativo - parcialmente purificado, y de hacer lo mismo con las fracciones ricas en marca de ^{14}C (P2, Fig. 11) que representan al complejo maduro, se evaluó la concentración de DNA en ambas muestras mediante el método de agarosa en placa (Fig. 12), con la finali - dad de estandarizar la cantidad de DNA que se usaría en los en - sayos frente a diferentes concentraciones de P32 y de anticuer - pos. Generalmente se obtuvieron de 25-35 μg de cromatina viral a partir de 10 cajas de células infectadas.

Lo primero que se hizo fué utilizar dos concentraciones - de proteína 32 (5 y 10 μg) frente a una concentración constante de DNA (175 ng de complejo replicativo-P1 o de complejo maduro), y

Fig. 11. Patrón de Sedimentación de los Minicromosomas de SV40 en el Gradiente de Sacarosa. Las células se infectaron y marcaron como está indicado en la Fig. 10, y la cromatina viral se ultracentrifugó en un gradiente de sacarosa. Se juntaron aquellas fracciones ricas en marca de ^3H para constituir al complejo replicativo parcialmente purificado (P1), y se hizo lo mismo -- para el ^{14}C el cual constituyó al complejo maduro (P2).

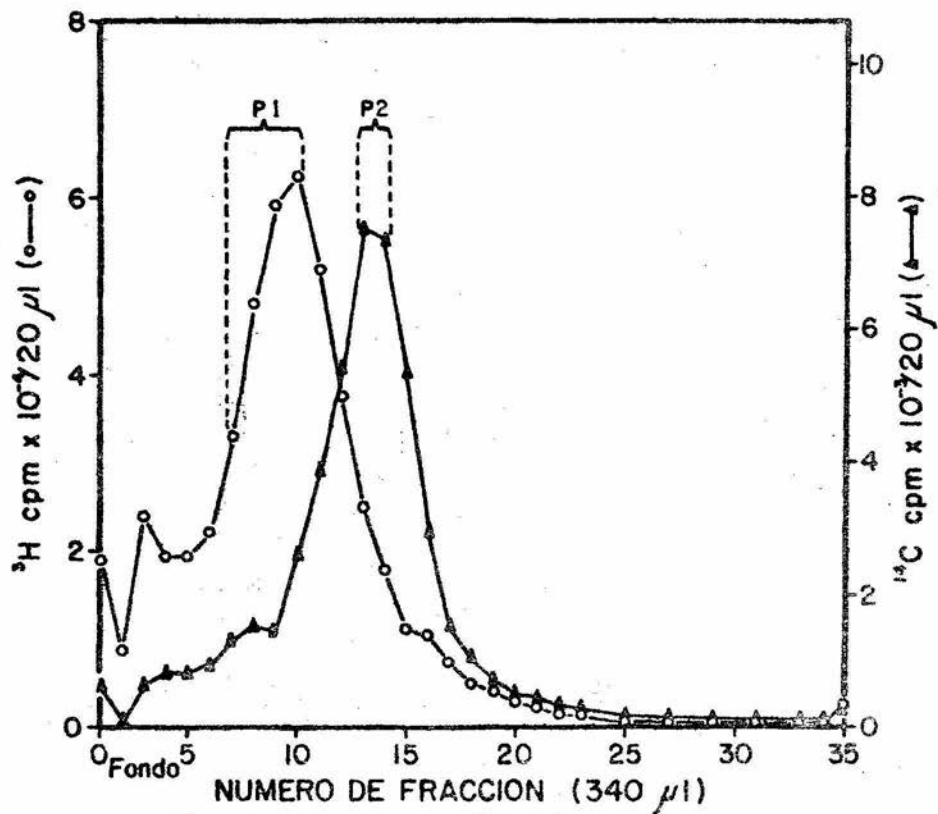
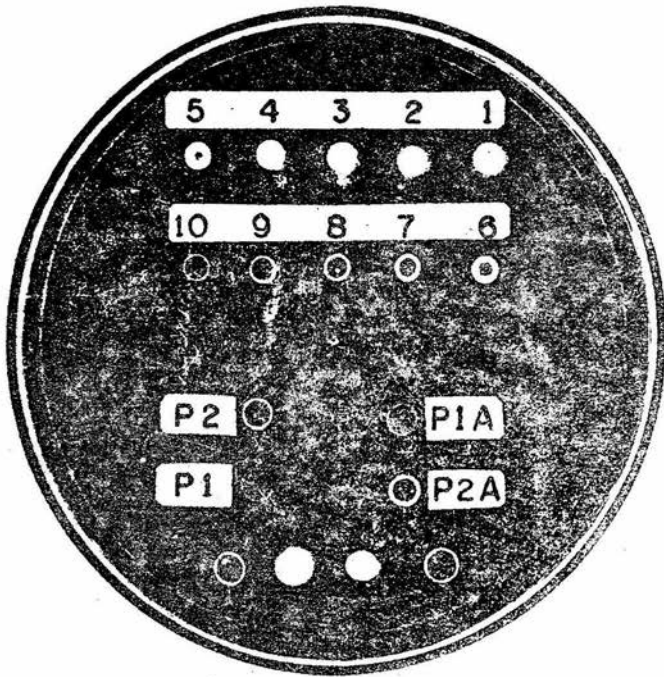


Fig. 12. Cuantificación de DNA en Placa de Agarosa. La placa se preparó como está descrito en Material y Metodos, y se colocó en ella 10 muestras con una concentración de DNA conocida: (1) $1\mu\text{g}$, (2) $0.5\mu\text{g}$, (3) 250 ng , (4) 125 ng , (5) $\approx 62\text{ ng}$ - (6) $\approx 31\text{ ng}$, (7) $\approx 15\text{ ng}$, (8) $\approx 7\text{ ng}$, (9) $\approx 3\text{ ng}$, (10) $\approx 1\text{ ng}$; y las muestras problema: (P1 y PA) complejo replicativo parcialmente purificado a 5 y $10\mu\text{l}$ respectivamente. (P2 y P2A) complejo ma duro a 5 y $10\mu\text{l}$ respectivamente.

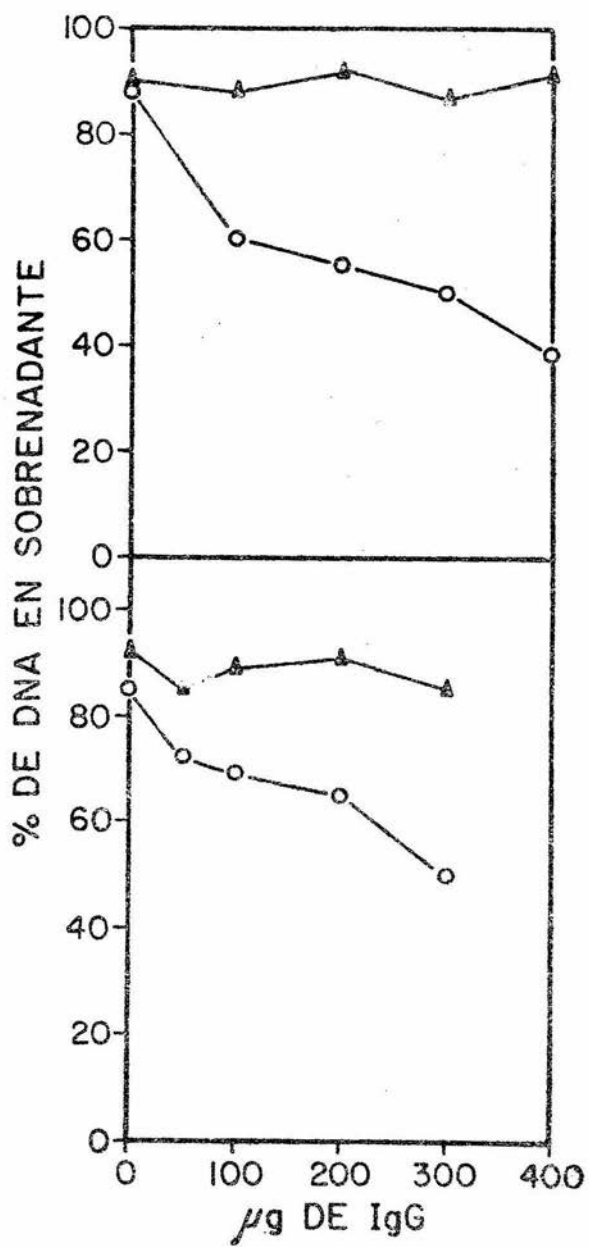


evaluándose a la vez diferentes concentraciones de anticuerpos (Fig. 13) para cada una de las dos concentraciones de P32. - Lo que se encontró fué un incremento en el porcentaje de precipitación del complejo replicativo conforme se aumentaba la cantidad de anticuerpos, mientras que para la P32 se vió que el porcentaje de precipitación era muy similar entre las dos concentraciones, aunque al parecer era un poco mayor en la concentración de 5 μ g alcanzándose hasta un 60% de precipitación con 400 μ g de IgG.

Cuando se puso únicamente proteína 32, el porcentaje de precipitación no fué mayor de 15%, y cuando no se agregó nada al ensayo se obtuvo no más del 10% de precipitación. En lo que respecta al complejo maduro, se observa claramente (Fig. 13) - que éste no es precipitable por el sistema de proteína 32 - anticuerpos.

Enseguida lo que se pretendió obtener fué la concentración óptima de proteína 32 para la inmunoprecipitación del complejo replicativo. Entonces se utilizó una concentración constante de DNA (150 ng de complejo replicativo-P1 o de complejo maduro), y se adicionaron diferentes concentraciones de proteína 32 (Fig. 14). La concentración de anticuerpos que se prefirió usar en éste ensayo fué de 200 μ g, y lo que se encontró fué que era mayor el porcentaje de precipitación cuando se utilizaban cantidades muy bajas de P32 (del orden de aproximadamente 1 μ g), alcanzándose casi un 40% de precipitación del complejo replicativo. Por su parte cuando se adicionaron solamente los anticuerpos contra la P32, se precipitó de 20-30% del complejo

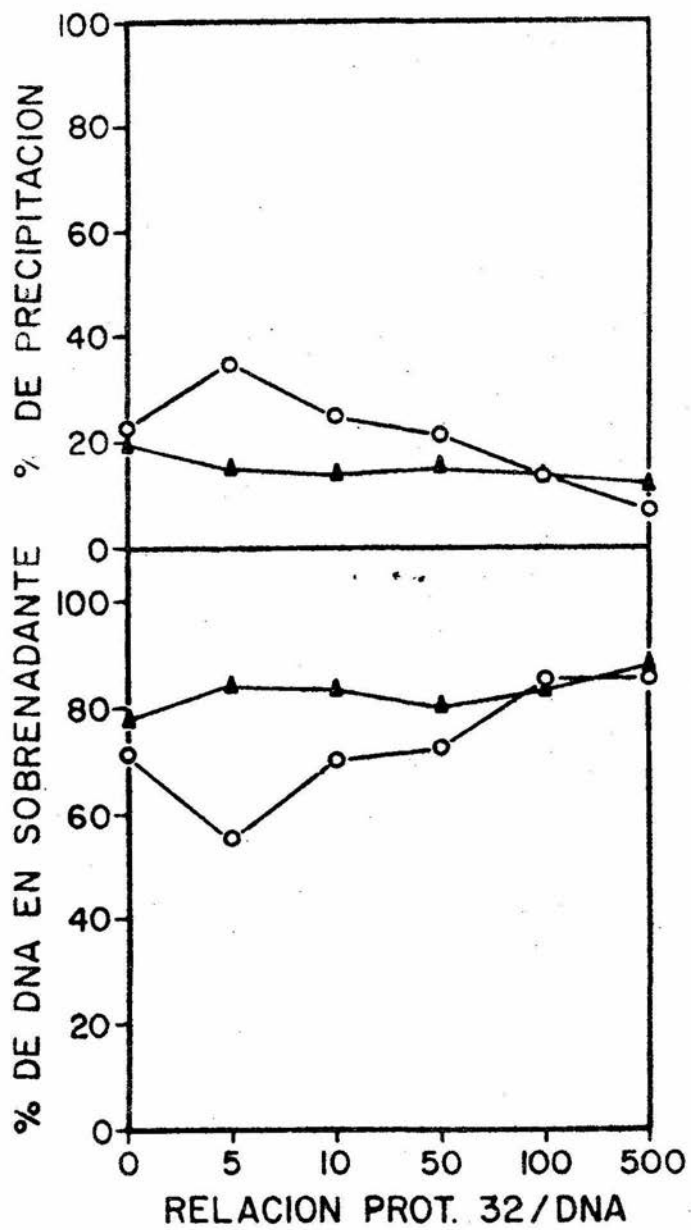
Fig. 13. Concentración Óptima de Anticuerpos. La cromatina viral se extrajo como está mostrado en la Fig. 11. Se usaron 100 μ l de complejo replicativo-P1 (O—O) por ensayo con una concentración de 5 μ g (a) y 10 μ g (b) de P32, incubándose durante 1 hr a 4°C. Se adicionaron diferentes concentraciones de anticuerpos contra la P32 y se incubó nuevamente por 1 hr a 4°C. Se centrifugó a 12,000 x g durante 15 min. y se evaluó la radioactividad en el sobrenadante. Lo mismo se hizo para el complejo maduro-P2 (Δ — Δ).



a

b

Fig. 14. Concentración de Proteína 32. Se utilizó una cantidad constante (150 ng) de complejo replicativo-P1 (O—O) por ensayo y se incubó con diferentes concentraciones de P32 durante 1 hr. a 4°C. Después se adicionaron 200 µg de anti-P32 por tubo y se incubó nuevamente por 1 hr. a 4°C. Se centrifugó a 12,000 x g durante 15 min. y se evaluó la radioactividad en el precipitado (a) y el sobrenadante (b). Lo mismo se hizo para el complejo -maduro (▲—▲).



a

b

replicativo.

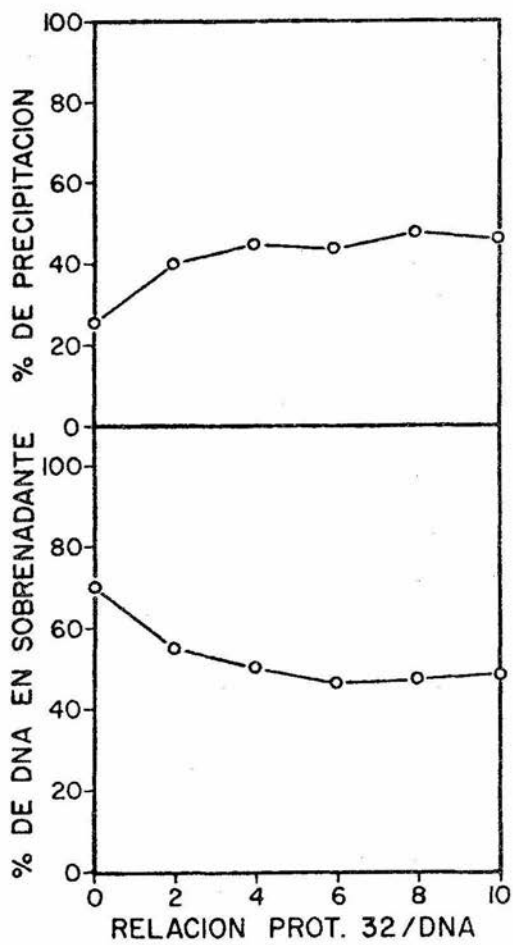
En lo que respecta al complejo maduro, se observó que no se precipitó, bajo las condiciones anteriormente descritas, más de un 20% (Fig. 14).

Después para encontrar la concentración óptima de P32 - dentro del rango de 0 hasta aproximadamente $2\mu\text{g}$, se utilizó - una concentración constante (175 ng) de complejo replicativo-P1, la cual se inubó con diferentes concentraciones de P32 (Fig. - 15) dentro del rango mencionado. Esta vez se usó una concentra ción de anticuerpos de $400\mu\text{g}$ y se encontró que $1\mu\text{g}$ de P32 - (relación P32/DNA = 6) era suficiente para alcanzar de 50-55% de precipitación. Nuevamente se observó que los anticuerpos por sí solos precipitan de 20-30% del complejo replicativo.

Para optimizar aún más las condiciones de la inmunoprecipitación del complejo replicativo por el sistema de proteína 32 - anticuerpos, se probaron diferentes tiempos de incubación y 2 temperaturas (4 y 32°C) para la proteína 32. El resultado obtenido se muestra en la Fig. 16, en donde se vé que un tiempo de 2 hr. es suficiente para alcanzar de 55-65% de precipitación a una temperatura de 4°C . En lo que respecta a la temperatura de 32°C , no se detectaron claras diferencias en relación con la temperatura de 4°C , por lo que se prefirió continuar - empleando ésta última.

Las dos condiciones de tiempo y temperatura de incubación ensayadas para la P32 se evaluaron ahora con los anticuer

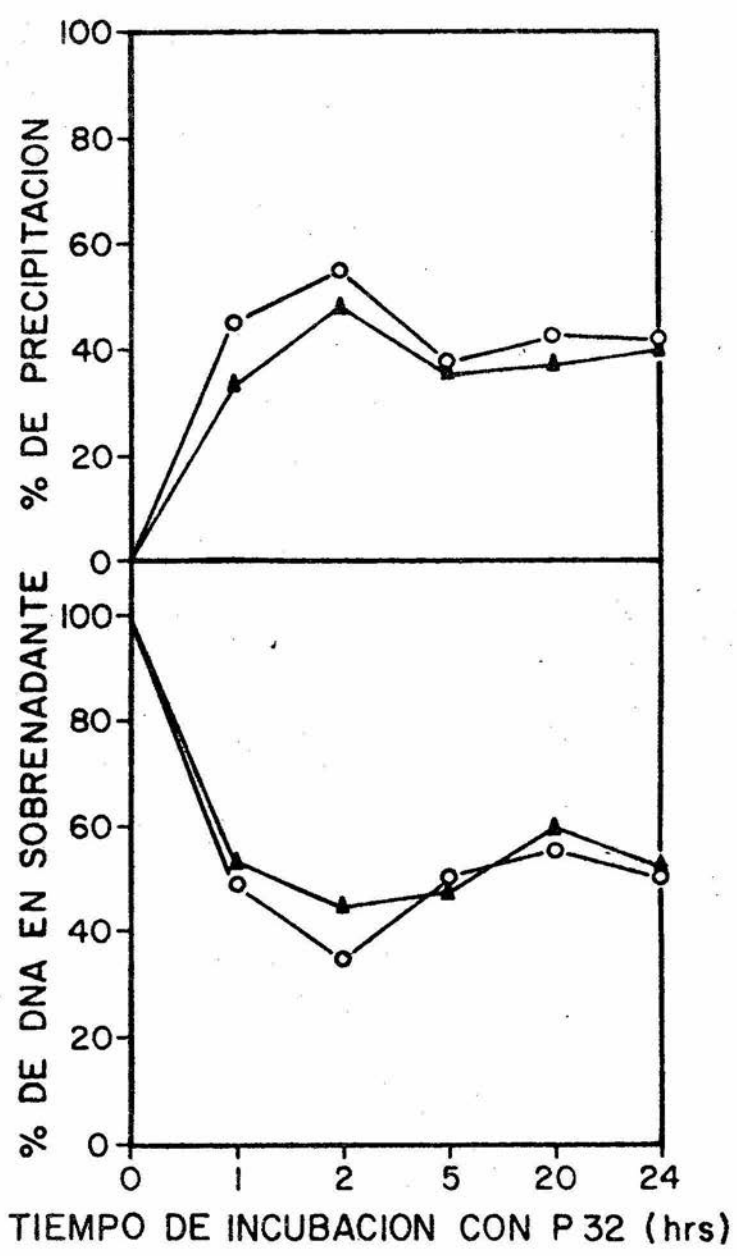
Fig. 15. Concentración Optima de Proteína 32. Una cantidad constante de complejo replicativo parcialmente purificado -- (175 ng) se incubó con diferentes concentraciones de P32 durante 1 hr. a 4°C. Enseguida se adicionaron 400 µg/tubo de anti-P32 y se incubó nuevamente por 1 hr. a 4°C. Se centrifugó a 12,000 x g durante 15 min. y se evaluó la radioactividad en el precipitado (a) y el sobrenadante (b).



a

b

Fig. 16. Tiempo de Incubación y Temperatura Optima para la Proteína 32. Una cantidad constante (175 ng) de complejo replicativo parcialmente purificado se incubó con $1 \mu\text{g}$ de P32 a diferentes tiempos. Las reacciones fueron paradas por la adición de $400 \mu\text{g}$ de anti-P32 por tubo, incubándose por 1-hr. a 4°C . Se centrifugó a $12,000 \times g$ durante 15 min. y se evaluó la radioactividad en el precipitado (a) y el sobrenadante (b). (O—O) 4°C . (▲—▲) 32°C .



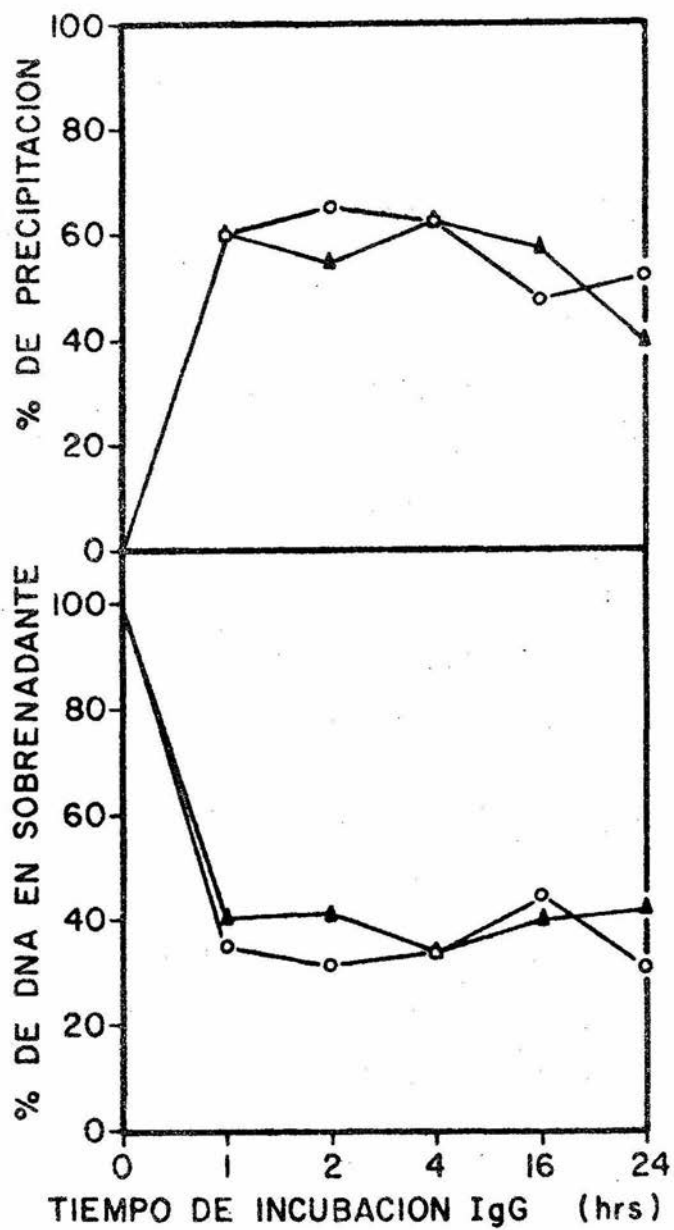
a

b

pos (Fig. 17), solo que las temperaturas ésta vez fueron 4°C y 37°C. Lo que se observó fué que un tiempo de 2-4 hr. a la temperatura de 4°C era suficiente para alcanzar de 60-70% de precipitación del complejo replicativo, y que éste porcentaje era alcanzado en 1 hr. a 37°C. Este resultado se observó tomándose en cuenta el % de DNA en el sobrenadante (Fig. 17b), pero si se toma en cuenta el resultado obtenido en el precipitado (Fig. 17a) no se observa una clara diferencia entre las dos temperaturas ensayadas. Entonces se decidió considerar a la temperatura de 4°C como la temperatura de inmunoprecipitación, tomándose también en cuenta que en ésta temperatura se encuentra el complejo desde que se inicia la extracción.

Con todas las condiciones previamente descritas se exploró la posibilidad de si el sistema de proteína 32 - anticuerpos precipitaba inespecíficamente al complejo maduro. Para ello se obtuvo cromatina de SV40 marcada únicamente durante un tiempo largo (16 hrs.) con ³H-Timidina, pero con una gran cantidad de cuentas por minuto/ μ g de DNA. Esto se hizo con la finalidad de poder diluir al complejo maduro y evaluar diferentes concentraciones de éste en la inmunoprecipitación. La cromatina viral extraída se sedimentó en un gradiente de sacarosa (Fig. 18) y se reunieron las fracciones con mayor cantidad de radioactividad (P2) las cuales contenían al complejo maduro. También se reunieron las fracciones que se sabía correspondían al complejo replicativo (P1, Fig. 18) y a partir de estas dos muestras se realizó el ensayo. Se utilizaron 3 concentraciones diferentes de complejo maduro (Fig. 19) y una de complejo replicativo, adicionándose una cantidad constante de P32, y

Fig. 17. Tiempo de Incubación y Temperatura Optima para los Anticuerpos contra la Proteína 32. 175 ng de complejo replicativo parcialmente purificado se incubaron con $1 \mu\text{g}$ de P32- durante 2 hrs. a 4°C y después se adicionaron $400 \mu\text{g}$ de anti-P32 incubandose a diferentes tiempos. La reacción se paró -- por centrifugación a $12,000 \times g$ durante 15 min. y se evaluó la radioactividad en el precipitado (a) y el sobrenadante - (b). (\blacktriangle — \blacktriangle) 4°C . (\circ — \circ) 37°C .



a

b

Fig. 18. Perfil de Sedimentación del Complejo Maduro. Las células CV1 infectadas con SV40 se marcaron a las 24 h.p.i. con $200 \mu\text{Ci/ caja}$ de ^3H -Timidina durante 16 hrs. A las 40 h.p.i. la cromatina viral se extrajo como está descrito en Material y Métodos, y se sometió a una sedimentación en un gradiente de sacarosa. Se juntaron las fracciones que contenían la mayor cantidad de radioactividad (complejo maduro) para constituir a P2.- P1 es el complejo replicativo parcialmente purificado que en éste caso no es detectable.

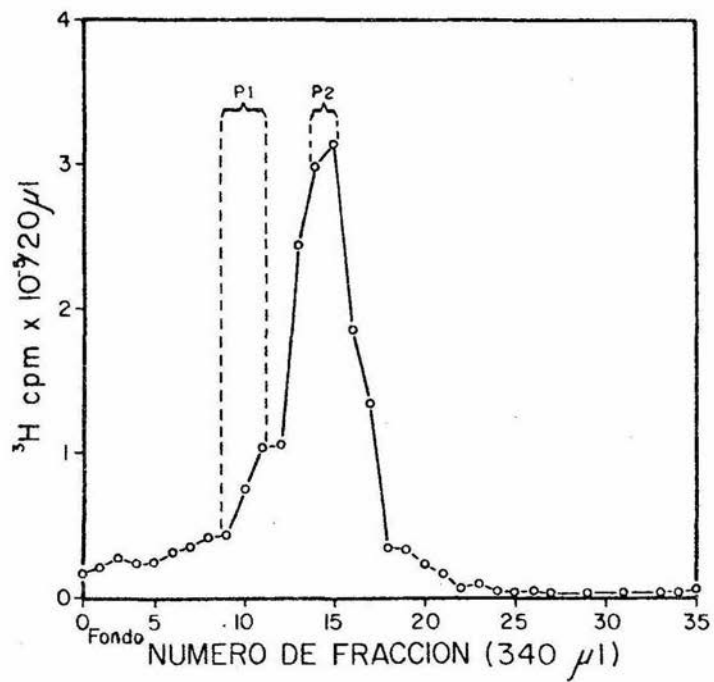
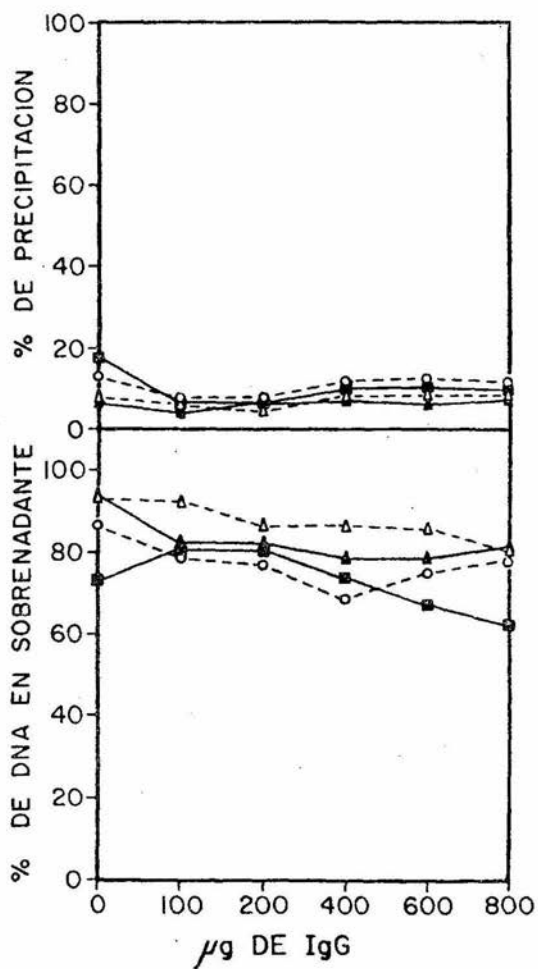


Fig. 19. Ensayo de Precipitación del Complejo Maduro. Tres -
concentraciones diferentes de complejo maduro se incubaron con
 $1 \mu\text{g}$ de P32 durante 2 hr. a 4°C , y enseguida se adicionaron -
 $400 \mu\text{g}$ de anti-P32 incubandose durante 4 hr. a 4°C . Se centri-
fugó a $12,000 \times g$ durante 15 min. y se evaluó la radioactivi-
dad en el precipitado (a) y el sobrenadante (b). (\blacktriangle — \blacktriangle) com-
plejo maduro directo. (\triangle — \triangle) complejo maduro dilución 1:5. -
(\blacksquare — \blacksquare) complejo maduro dilución 1:25. (O—O) complejo repli-
cativo directo. Para cada ensayo se utilizaron $100 \mu\text{l}$ de com-
plejo.



a

b

variándose la concentración de anticuerpos. Lo que se encontró fué que el complejo maduro no era precipitable por el sistema de proteína 32 - anticuerpos, obteniéndose como máximo un 20% de precipitación si se toma en cuenta la radioactividad en el precipitado (Fig. 19a), y un 20% (complejo maduro directo y dilución 1:5) ó 40% (dilución 1:25) tomándose en cuenta el porcentaje de DNA en el sobrenadante (Fig. 19b). En cuanto al complejo replicativo, se observó que la inmunoprecipitación de éste no es detectable con este tipo de experimentos (sin marcaje de pulso), ya que no hubo una clara diferencia en el porcentaje de precipitación en relación con el complejo maduro.

Una vez establecido que el complejo maduro no era precipitable por el sistema de proteína 32 - anticuerpos, se procedió a aplicar las condiciones óptimas de inmunoprecipitación del complejo replicativo para modificar el procedimiento de purificación parcial de complejos replicativos de SV40 en el gradiente de sacarosa. Para ésto, se obtuvo la cromatina viral (Fig. 20) y se incubó con la proteína 32 y los anticuerpos antes de ser sometida a sedimentación en el gradiente de sacarosa. Finalizada la migración, se fraccionó el gradiente y se encontró que en el fondo del tubo había un precipitado que contenía una gran cantidad de marca de ^3H (correspondiente a complejos replicativos) (Fig. 21). También se observó que parte de ésta radioactividad se encontraba dispersa en las fracciones del fondo del tubo (fracciones 1-12), y que el patrón de sedimentación del complejo maduro (marcado con ^{14}C) no había sufrido alteración alguna. En el precipitado se detectó una pequeña cantidad de ^{14}C , pero conviene aclarar aquí que los minicromosomas acti-

Fig. 20. Modificación al Método de Separación de Complejos Replicativos de SV40. En el esquema se muestra como antes de la sedimentación en el gradiente de sacarosa se puede incubar a la cromatina viral con proteína 32 y anticuerpos bajo las condiciones óptimas encontradas, y obtener la precipitación de complejos replicativos al ultracentrifugar el gradiente de sacarosa.

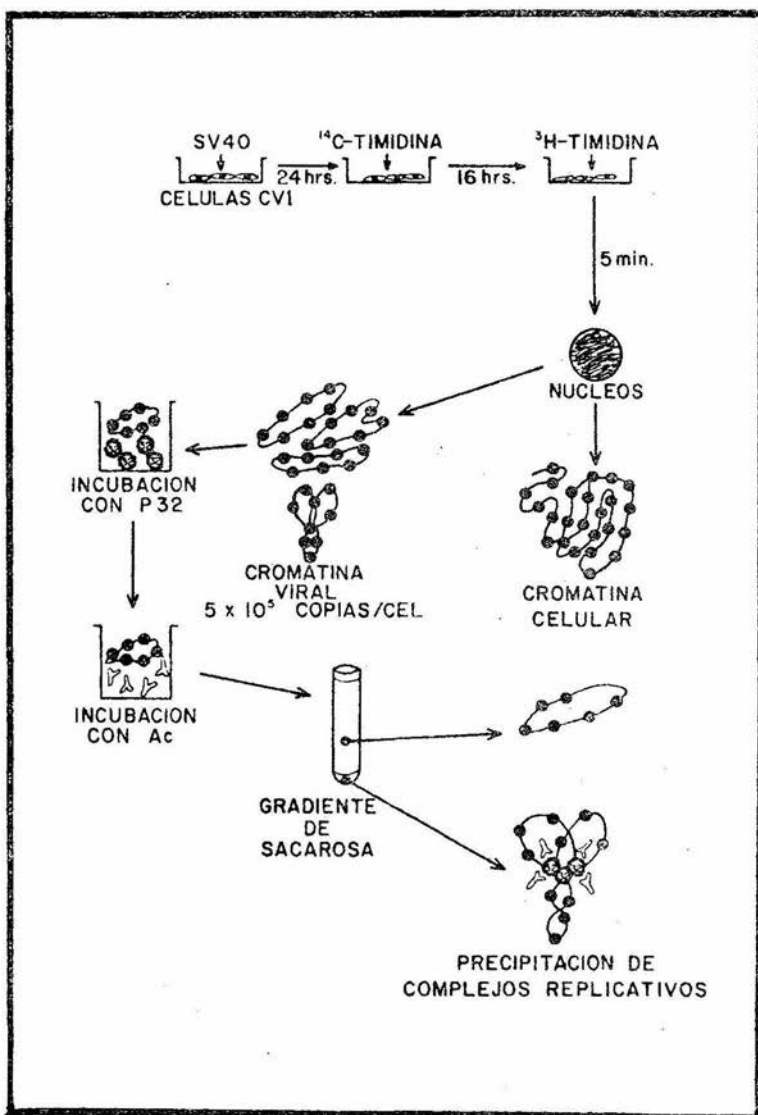
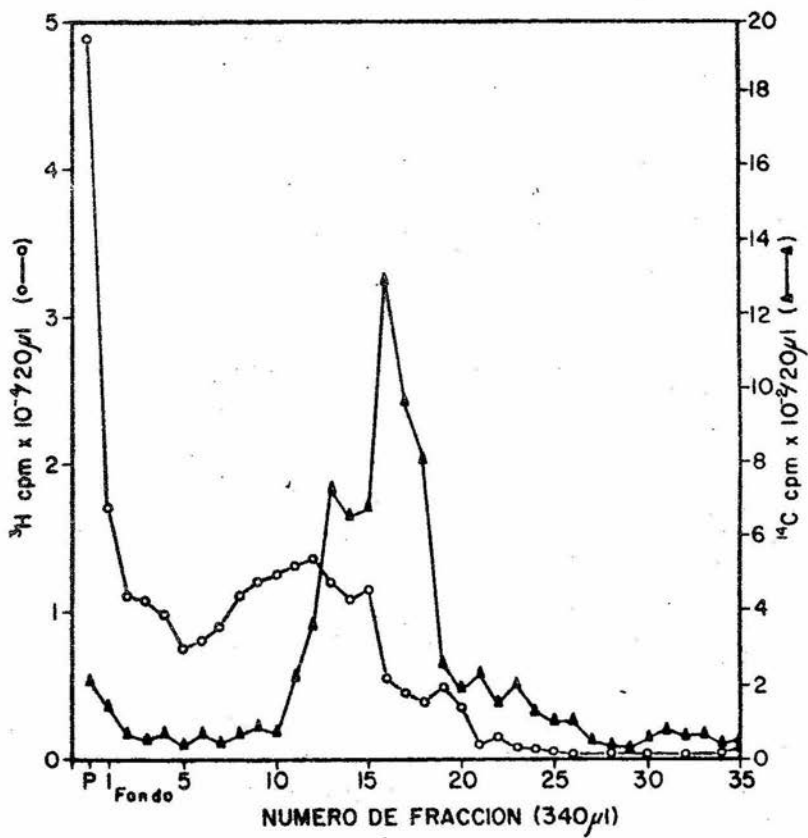


Fig. 21. Perfil de Sedimentación de la Cromatina de SV40 Tratada con Proteína 32 y Anticuerpos, en el Gradiente de Sacarosa. Las células se infectaron y marcaron como está indicado en la Fig. 20 y la cromatina viral (extraída según Material y Métodos) se incubó con 10 μ g de P32 durante 2 hr. a 4°C. Después se adicionaron 4 mg de anticuerpos contra la P32 y se incubó por 4 hr. a 4°C. La mezcla de reacción resultante se ultracentrifugó en un gradiente de sacarosa y se colectaron fracciones de 340 μ l. El precipitado (P) en el fondo del tubo se resuspendió en 340 μ l de amortiguador A25 y se determinó su radioactividad - así como la de cada una de las fracciones del gradiente.



vos en replicación también están marcados con ^{14}C en las cadenas parentales del DNA.

Para comprobar que el material presente en el precipitado obtenido en el gradiente de sacarosa era realmente complejos replicativos de SV40, se sometió una muestra a electroforesis en gel de agarosa, al igual que otras muestras de algunas de las fracciones del gradiente (Fig. 22), y lo que se vió fué que efectivamente se trataba de tales complejos replicativos. Además se observó que éstos complejos replicativos se encontraban en gran cantidad en el precipitado (en relación con otras fracciones del gradiente) siendo fácilmente observados incluso con el colorante Bromuro de Etidio en luz ultravioleta de onda corta (Fig. 22a, Garril P).

Así mismo una muestra del precipitado obtenido (Fig. 21), al igual que otras muestras de varias fracciones del gradiente de sacarosa se sometió a electroforesis en gel de Poliacrilamida-SDS (Fig. 23), y se observó que en éste precipitado se encontraban las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos, la proteína 32, las histonas (detectables también en las fracciones que contienen al complejo maduro), y 5 proteínas que se encontraban únicamente en ésta muestra, seguramente pertenecientes a la maquinaria de replicación.

Por último se realizó un experimento en el que se ultracentrifugaron dos gradientes de sacarosa en paralelo, uno de los cuales contenía cromatina de SV40 previamente tratada con P32 y anticuerpos, y otro que no había recibido tratamiento --

Fig. 22. Analisis Electroforético en Gel de Agarosa de Cromatina de SV40 Activa en Replicación Inmunoprecipitada en un -- Gradiente de Sacarosa con Proteína 32 y Anticuerpos. La cromatina de SV40 tratada con P32 y anti-P32 se ultracentrifugó como está descrito en la Fig. 21, y muestras de las fracciones -- con mayor radioactividad así como del precipitado obtenido se sometieron a electroforesis en gel de agarosa (a), del cual -- despues se obtuvo una autorradiografía (b). (15, 16) fracciones ricas en complejo maduro. (2, 3, 4, 8 y 10) fracciones -- del área del complejo replicativo. (P) precipitado. (Ori) -- origen de la migración. (R) complejos replicativos. (SV) marcador de SV40. (F I, F II y F III) las tres formas del complejo maduro, superhelicoidal, circular y líneal respectivamente.

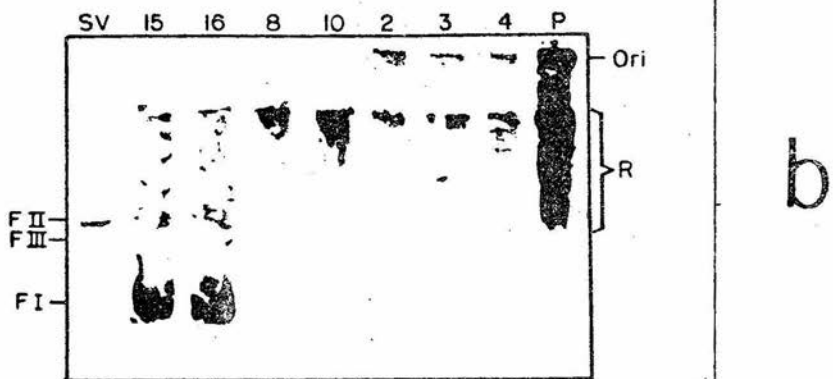
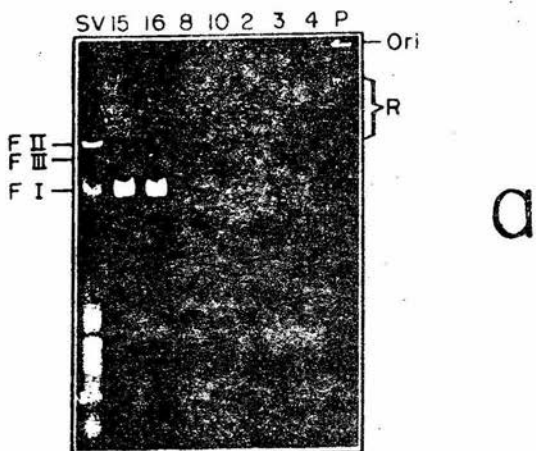
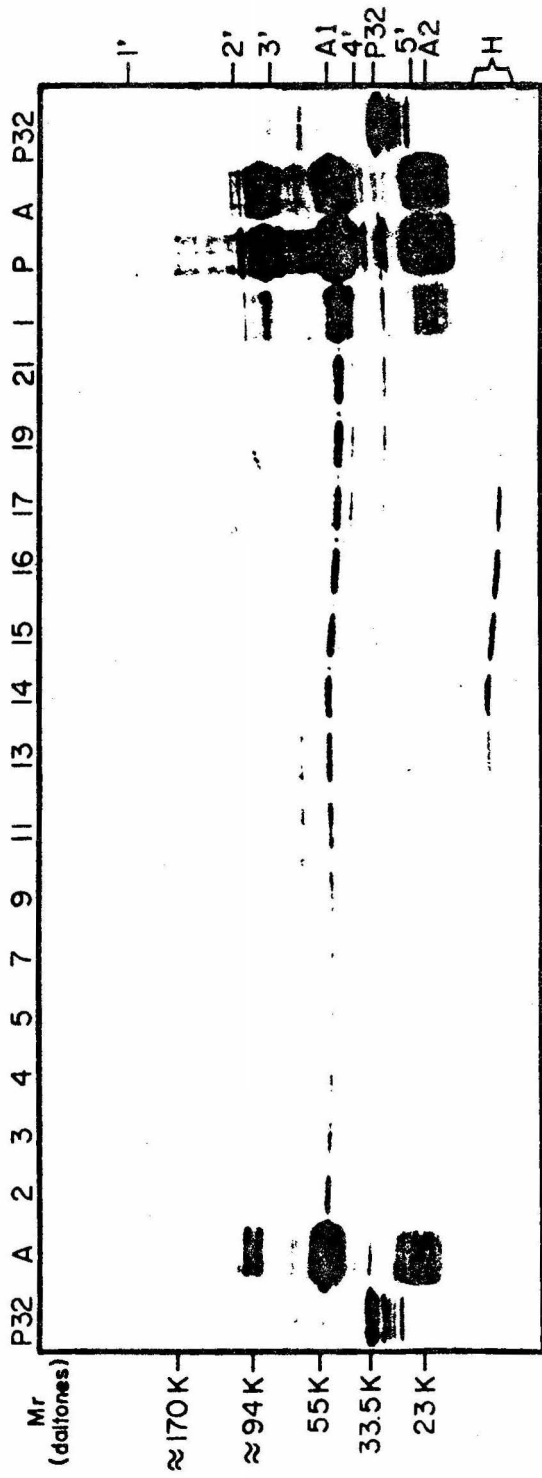
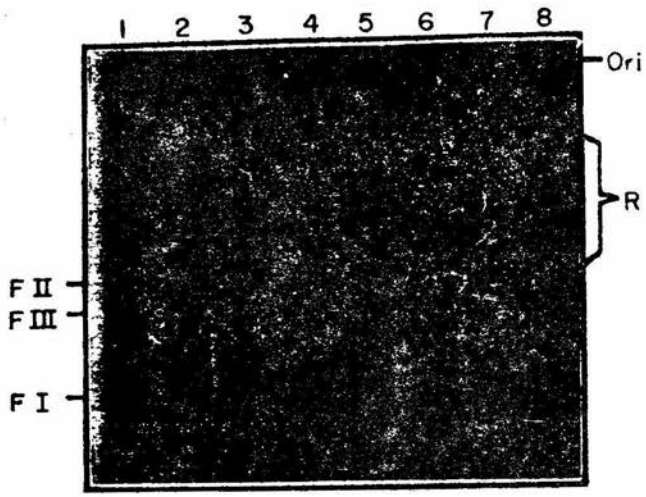


Fig. 23. Analisis Electroforetico en Gel de Poliacrilamida-SDS de Cromatina de SV40 Activa en Replicación Immunoprecipitada en un Gradiente de Sacarosa con Proteína 32 y Anticuerpos. Mues -- tras de las fracciones del gradiente de sacarosa descrito en la Fig. 21, así como del precipitado obtenido, se sometieron a elec troforesis en gel de Poliacrilamida-SDS. (1, 2, 3, 4, 5, 7 y 9) fracciones del área del complejo replicativo. (11, 13, 14, 15, 16, 17, 19 y 21) fracciones del área del complejo maduro. (P)- precipitado. (P32) marcador de proteína 32. (A) marcador de anticuerpos. (A1) cadenas pesadas de los anticuerpos. (A2) ca denas ligeras de los anticuerpos. (H) histonas.

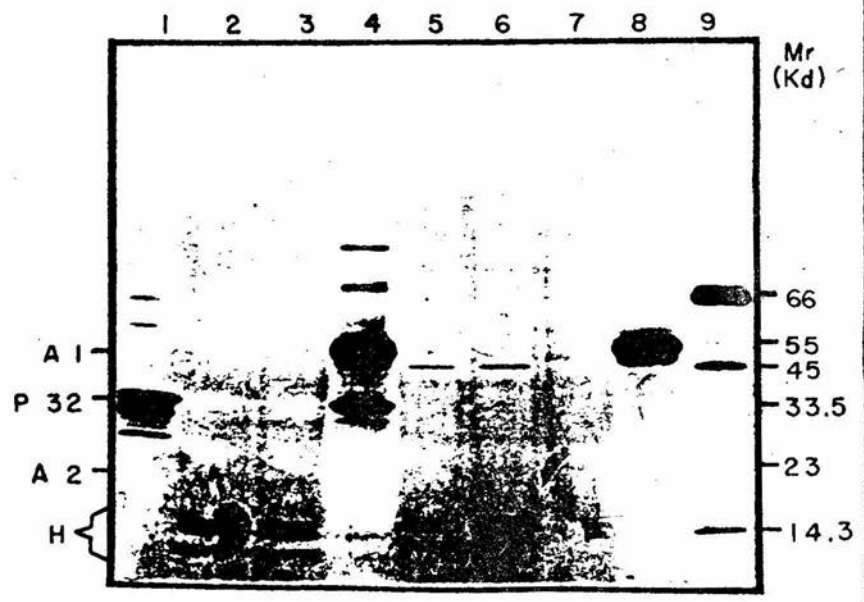


alguno. Al fraccionar los gradientes, nuevamente se encontró un precipitado con marca de ^3H en el gradiente tratado con P32 y anticuerpos (aunque la cantidad de radioactividad fué menor en relación con el experimento anterior) mientras que en el gradiente que no había recibido tratamiento no se encontró tal precipitado. En la electroforesis en gel de agarosa (Fig. 24a) se vió nuevamente que el precipitado obtenido contenía complejos replicativos de SV40 altamente puros, y en gel de Poliacrilamida-SDS (Fig. 24b) se volvió a encontrar que éste precipitado contenía, aparte de la P32, los anticuerpos y las histonas, algunas proteínas que eran únicas en ésta muestra.

Fig. 24. La cromatina de SV40 (extraída según Material y Métodos) se incubó con P32 y anti-P32 de acuerdo a como está descrito en la Fig. 21. Después se ultracentrifugó en un gradiente de sacarosa (Fig. 21) y en paralelo se corrió otro gradiente con una muestra sin P32 ni anti-P32 (Fig. 11). a) Muestras de las fracciones de ambos gradientes se sometieron a electroforesis en gel de agarosa, del cual se muestra la autorradiografía: Gradiente sin tratamiento: (Carril 1) complejo replicativo; (Carril 2) complejo maduro; (Carriles 3 y 4) precipitado, 60 y 30 μ l respectivamente. Gradiente con P32 y anti-P32: (Carril 5) complejo replicativo; (Carril 6) complejo maduro; (Carriles 7 y 8) precipitado, 60 y 30 μ l respectivamente. b) Electroforesis de las fracciones de ambos gradientes en gel de Poliacrilamida SDS. (Carril 1) marcador de P32. (Carriles 2, 3 y 4) complejo replicativo, complejo maduro, y precipitado del gradiente con P32 y anti-P32 respectivamente. (Carriles 5, 6 y 7) complejo replicativo, complejo maduro y precipitado del gradiente sin tratamiento respectivamente. (Carril 8) marcador de anticuerpos: (A1) cadenas pesadas; (A2) cadenas ligeras. (Carril 9) -- marcadores con peso molecular indicado.



a



b

ANÁLISIS DE RESULTADOS
Y
DISCUSIÓN

El procedimiento empleado en éste trabajo para la obtención de la proteína 32 es el mismo que está reportado por Bittner, et al.(39), sin embargo hubo una diferencia en cuanto al rendimiento obtenido, ya que ellos reportan la obtención de 156 mg de P32 a partir de 60 g de bacterias, mientras que aquí se obtuvieron únicamente 96 mg. La diferencia en éste resultado posiblemente se deba a una desigual producción de la P32 por las bacterias desde el momento mismo en que éstas han sido infectadas por el bacteriófago T4, pudiendo afectar las condiciones medioambientales (nutrientes, pH) que están bien controladas en un fermentador (empleado por Bittner y colaboradores) durante el crecimiento e infección de las bacterias, y no en los frascos empleados en éste trabajo, en los que únicamente se controló a la temperatura.

En el ensayo de precipitación de DNA de cadena sencilla se reprodujeron los datos obtenidos por Rosales (52), sin embargo en nuestro ensayo se encontró un 35% de precipitación para el DNA de cadena doble. Esta precipitación se pudo haber debido a la interacción de la P32 con extremos de DNA de cadena sencilla formados en algunos fragmentos de DNA de cadena doble al momento del rompimiento de éste con la jeringa durante su obtención.

El dato de que el complejo maduro no es precipitable por el sistema de proteína 32 - anticuerpos es algo que ya había sido encontrado por Rosales (52), y el 40% de precipitación que se obtuvo (si se toma en cuenta el porcentaje de DNA en el sobrenadante, Fig. 19b) puede ser un dato irreal, ya que no existe una correspondencia entre la radioactividad en el precipitado y el sobrenadante (Fig. 19).

El presente trabajo da evidencias de que la proteína codificada por el gen 32 del bacteriófago T4 interacciona con el complejo de replicación de SV40, pero no muestra si la interacción es con regiones desnudas de DNA de cadena sencilla presentes en el complejo (29), o bien con alguna de las proteínas de la maquinaria de replicación eucariótica, que pudieran tener alguna homología con las proteínas de procariotes (17). Se sabe que la proteína 32 interacciona con otras proteínas de la maquinaria de replicación del bacteriófago T4 (como la DNA polimerasa), e incluso se ha utilizado a la P32 para purificar a tales proteínas (54).

Con respecto a los anticuerpos contra la P32 empleados en este trabajo, se observó que se requiere de grandes cantidades de anticuerpos (400 μg de IgG/ μg de P32) para lograr de 60-70% de precipitación de los complejos replicativos (P1) (150 ng). El empleo de grandes cantidades de anticuerpos puede representar un problema en el momento de intentar la detección de proteínas del complejo que se encuentran en muy baja cantidad, ya que estas proteínas de alguna manera pueden ser encubiertas por la gran cantidad de anticuerpos. Una alternativa a esto podría ser

la purificación de los anticuerpos mediante el empleo de una columna de afinidad con la P32 acoplada. Con esto quizá se obtendrían anticuerpos altamente específicos y se podría emplear una menor cantidad en la inmunoprecipitación.

El que los anticuerpos contra la P32 precipitaran un cierto porcentaje (de 20 a 40%) del complejo replicativo de SV40 por sí solos, fué un hecho que se notó a lo largo de varios experimentos en los que se probó éste control. Este hecho se pudo haber debido a un reconocimiento inespecífico de los anticuerpos, o bien a la existencia de un cierto porcentaje de homología entre alguna proteína propia del complejo, y la P32. Esta homología finalmente puede originar reacciones cruzadas para un mismo anticuerpo. Quizá el empleo de alguna técnica como la de inmunotransferencia de proteínas podría ayudar a esclarecer si realmente los anticuerpos contra la P32 reconocen alguna proteína del complejo de replicación de SV40.

Los dos últimos experimentos de éste trabajo muestran que los complejos replicativos de SV40 separados por el sistema de proteína 32 - anticuerpos son altamente puros (Fig. 22 y 24a), y están completamente separados del complejo maduro. Sin embargo la causa de la diferencia en la cantidad de complejos precipitados entre estos dos experimentos es algo que permanece por ser determinado. Algunos autores ya han realizado otros intentos para lograr la purificación total del complejo de replicación de SV40 (18). Waqar & Huberman (58) han reportado uno de éstos intentos, que consiste en la filtración en gel (Sefarosa 4B), en la cual se mantiene una baja fuerza iónica -

(previniéndose la pérdida de alguna de las proteínas del complejo), pero que finalmente no proporcionó el resultado esperado ya que ambos minicromosomas maduros y replicativos eluyeron en el volumen vacío, con lo que no obtuvieron separación alguna. Estos mismos autores (58), han reportado el empleo de otras técnicas como son la de centrifugación isopícnica en gradientes de Metrizamida y la de electroforesis en geles de Agarosa, las cuales según ellos sí proveen de una buena separación entre los minicromosomas maduros y los replicativos, pero desafortunadamente la actividad de síntesis del DNA in vitro es defectiva o se pierde totalmente en los complejos de replicación purificados, indicando que existe la pérdida de algunos de los componentes del complejo durante la separación.

La actividad de síntesis del DNA en los complejos replicativos purificados mediante el sistema de proteína 32 - anticuerpos posiblemente es difícil de evaluar, por la presencia misma de los anticuerpos y la P32 que de alguna manera podrían bloquear el paso de la DNA polimerasa. Sin embargo, queda como alternativa el empleo de columnas de P32 o de anti-P32 en la purificación de los minicromosomas activos en replicación. El uso de tales columnas (P32 o anti-P32 acoplados a alguna resina) podría proveer de ciertas ventajas al momento de evaluar la capacidad de síntesis del DNA en los complejos de replicación purificados, ya que en éstos ya no estarían presentes los anticuerpos o incluso la P32.

Un objetivo posterior a éste trabajo, podría ser la identificación de la posible función de algunas de las proteí-

nas presentes en los complejos replicativos purificados por el sistema de proteína 32 - anticuerpos. En la figura 23 se muestran 5 proteínas que se encuentran únicamente en el precipitado que contiene a los complejos replicativos. La proteína 1' - (con Mr superior a los 170 Kd) posiblemente sea uno de los fragmentos que forman parte de la DNA polimerasa α , ya que entimo de ternera Holmes (17) ha reportado un peso molecular -- para ésta enzima de 210 a 230 Kd, y en hígado de la rata -- de Recondo (17) ha reportado valores similares en el peso molecular de ésta proteína. Así mismo Baril (17) ha reportado un -- peso molecular de 220 Kd para la forma α_3 de la DNA polimerasa en células Hela. Sin embargo la existencia de una gran cantidad de variables (el modo de electroforesis en gel, el tipo de células empleado, la sensibilidad de la enzima a degradación -- proteolítica, y la existencia de múltiples formas de la α -polimerasa), durante la evaluación del peso molecular de la DNA polimerasa α (en varios eucariotes), ha originado que se hayan -- reportado valores desde 70,000 hasta 1 millón de daltones en -- su peso molecular (17). Con respecto a la proteína 2' (Fig. -- 23), que presenta una Mr ligeramente superior a los 94 Kd, posiblemente se trate de otro fragmento de la DNA polimerasa α . Hübscher (17) ha reportado la existencia de un core catalítico de aproximadamente 125 Kd en la DNA polimerasa α de timo de -- ternera y en varias DNA polimerasas de procariotes y eucariotes inferiores. El empleo de anticuerpos contra la DNA polimerasa α podría ayudar en la identificación de los componentes -- de ésta enzima en los complejos de replicación obtenidos en -- éste trabajo.

Otra proteína que posiblemente esté presente en los complejos replicativos de SV40 purificados mediante el sistema de proteína 32 - anticuerpos, podría ser el antígeno T, del cual se conoce que es necesario para la iniciación de la síntesis del DNA (7,9,55). Se han reportado pesos moleculares de aproximadamente 81 Kd para el antígeno T grande, y 27 Kd para el antígeno T pequeño (9), los cuales podrían corresponder con las proteínas 3^a y 5^a (Fig. 23) que están presentes en los mencionados complejos de replicación purificados. Nuevamente el empleo de anticuerpos podría representar una excelente herramienta en la elucidación de esto.

Finalmente con respecto a la proteína 4^a (Fig. 23), con Mr intermedia entre 33.5 y 55 Kd, seguramente se trata de algún otro componente del complejo, de los cuales probablemente debe haber muchos más (topoisomerasa, ligasa, desestabilizadora de hélice, etc.), y que para su identificación podrían requerir de una elución a partir del gel de poliacrilamida-SDS, seguida por una renaturalización (56) y posterior evaluación de su actividad.

La purificación y análisis de sistemas como el del complejo de replicación de SV40, de alguna manera contribuyen para un mejor entendimiento de algunos de los eventos de la replicación de la cromatina (fase del ciclo celular relacionada con fenómenos de división, diferenciación y transformación celular), los cuales suceden de una manera muy similar en los cromosomas de las células eucarióticas.

C O N C L U S I O N

La proteína 32 del bacteriófago T4 de alguna manera - interacciona con el complejo de replicación de SV40 por lo - que mediante el empleo de un sistema de proteína 32 - anti - cuerpos se puede precipitar, bajo las condiciones óptimas encontradas, de 60-70% de tales complejos. Se sugiere que ésta - estrategia puede servir para concentrar y purificar al comple - jo de replicación de SV40 para su posterior análisis.

La proteína 32 como tal, no es suficiente para precipi - tar el complejo de replicación de SV40, mientras que los anti - cuerpos por sí solos precipitan de 30-40% del susodicho com - plejo.

En lo que respecta al complejo maduro, éste no es preci - pitable por el sistema de proteína 32 - anticuerpos bajo las - condiciones óptimas de precipitación del complejo replicativo.

R E F E R E N C I A S

- 1.- Goodenough, U. (1981). Genética. Ediciones Omega, S.A. España.
- 2.- Brown, D.D. (1981). Gene Expression in Eukaryotes. Science. - 211:667-74.
- 3.- Lewin, B. (1983). Genes. Ed. John Wiley & Sons. U.S.A.
- 4.- Igo Kemenes, T., Wolfram, H., Zachau, H.G. (1982). Chromatin. - Ann. Rev. Biochem. 51:89-121.
- 5.- Lahninger, A.L. (1980). Bioquímica. Ediciones Omega S.A. España.
- 6.- Watson, J.D. (1978). Biología Molecular del Gen. Fondo Educativo Interamericano S.A. España.
- 7.- DePamphilis, M.L., Wassarman, P.M. (1980). Replication of Eukaryotic Chromosomes: A Close-Up of the Replication Fork. Ann. Rev. Biochem. 49:627-66.
- 8.- Kornberg, A. (1980). DNA Replication. Ed. W.H. Freeman & Company. U.S.A.
- 9.- Tooze, J. (1981). DNA Tumor Viruses. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory. U.S.A.
- 10.- Scott, W.A., Wigmore, D.J. (1978). Sites in Simian Virus 40 - Chromatin which are Preferentially Cleaved by Endonucleases. Cell. 15:1511-18.
- 11.- Harper, F., Florentin, Y., Puvion, E. (1984). Localization of T-Antigen on Simian Virus 40 Minichromosomes by Immunoelectron Microscopy. The EMBO Journal. 3:1235-41.
- 12.- Tegtmeyer, P., Lewton, B.A., DeLucia, A., Wilson, V.G., Ryder, K. - (1983). Topography of Simian Virus 40 A Protein-DNA Complexes: Arrangement of Protein Bound to the Origin of Replication. J. of Virol. 46:151-61.

- 13.-Lewton, B.A., DeLucia, A., Tegtmeyer, P. (1984). Binding of Simian Virus 40 A Protein to DNA with Deletions at the Origin of Replication. *J. of Virol.* 49:9-13.
- 14.-Cremisi, C., Chestier, A., Yaniv, M. (1978). Assembly of SV40 and Polyoma Minichromosomes during Replication. *Symposia on Quantitative Biology*. Vol. XLII. No. 1. pp. 409-16 - C.S.H.L. U.S.A.
- 15.-Luria, S.E., Darnell, J.E., Baltimore, D., Campbell, A. (1978). *General Virology*. 3rd . Edition. Ed. John Wiley & Sons - U.S.A.
- 16.-Nagata, K., Guggenheimer, R.A., Hurwitz, J. (1983). Specific - Binding of a Cellular DNA Replication Protein to the Origin of Replication of Adenovirus DNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 80:6177-81.
- 17.-Fry, M. Eukaryotic DNA Polymerases. en Jacob, S.T. (1983). *Enzymes of Nucleic Acid Synthesis and Modification*. Vol.I. pp.39-92. CRC Press Inc. U.S.A.
- 18.-Molineux, I., Kohiyama, M. (1978). DNA Synthesis, Present - and Future. Ed. Plenum Press. U.S.A.
- 19.-Kolber, A.R., Kohiyama, M. (1974). Mechanism and Regulation of DNA Replication. Ed. Plenum Press. U.S.A.
- 20.-Nagata, K., Guggenheimer, R.A., Hurwitz, J. (1983). Adenovirus DNA Replication in vitro; Synthesis of Full-length DNA - with Purified Proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 80:4266-70.
- 21.-Freedlander, E.F., Taichman, L., Smithies, O. (1978). Segregation of Some Chromosomal Proteins during Cell Replication. *Symposia on Quantitative Biology*. Vol.XLII. No.1. pp.417-20. C.S.H.L. U.S.A.
- 22.-Seale, R.L. (1977). Persistence of Nucleosomes on DNA during

- Chromatin Replication. Simposia on Quantitative Biology. -
Vol. XLII. No.1. pp.433-38. C.S.H.L. U.S.A.
- 23.-Gusik, M.E., Herman, T.M., DePamphilis, M.L., Wassarman, P.M. -
(1981). Structure of Chromatin at Deoxyribonucleic Acid -
Replication Forks: Premucleosomal Deoxyribonucleic Acid -
is Rapidly Excised from Replicating Simian Virus 40 Chromo-
somes by Micrococcal Nuclease. *Biochemistry*. 20:6648-58.
- 24.-Yurov, Y.B. (1980). Rate of DNA Replication Fork Movement
within a Single Mammalian Cell. *J.Mol.Biol.* 136:339-42.
- 25.-Krauss, M.R., Gurlie, B.B., Bayne, M.L., Benbow, R.M. (1984). -
Polyomavirus Minichromosomes: Associated DNA Topoisomerase
II and DNA Ligase Activities. *J. of Virol.* 49:333-42.
- 26.-Kaufmann, G., Falk, H.H. (1982). An Oligaribonucleotide Poli-
merase from SV40-Infected Cells with Properties of a Pri-
mase. *Nucl.Acids Res.* 10:2309-21.
- 27.-Richter, A., Otto, B., Knippers, R. (1981). Replication of SV40
Chromatin in Extracts from Eggs of Xenopus laevis. *Nucl. -
Acids Res.* 9:3793-3807.
- 28.-Edenberg, H.J., Waqar, M.A., Huberman, J.A. (1977). DNA Synthe-
sis by Partially Purified Replicating Simian Virus 40 Chromo-
somes. *Nucl.Acids Res.* 4:3083-95.
- 29.-Herman, T.M., DePamphilis, M.L., Wassarman, P.M. (1979). Struc-
ture of Chromatin at Deoxyribonucleic Acid Replication -
Forks: Okazaki Fragments Released from Replicating SV40 -
Chromosomes by Single Strand Specific Endonucleases are not
in Nucleosomes. *Biochemistry*. 18:4563-71.
- 30.-Sundin, O., Varshavsky, A. (1980). Terminal Stages of SV40 DNA
Replication Proceed via Multiply Intertwined Catenated Di-
mers. *Cell*. 21:103-14.

- 31.-Gariglio, P., Mousset, S. (1975). Isolation and Partial Characterization of a Nuclear RNA Polymerase-SV40 DNA Complex. - FEBS Lett. 56:149.
- 32.-Ilopis, R., Ferrin, F., Bellard, F., Gariglio, P. (1981). Quantitation of Transcribing Native Simian Virus 40 Minichromosomes Extracted from CV1 Cells Late in Infection. J. of Virol. 38:82.
- 33.-Fiers, W., Contreras, R., Haegeman, G., Rogiers, R., Van de Voorde, A., Van Heuverswyn, H., Van Herreweghe, J., Volckaert, G., Yasebaert, M. (1978). Complete Nucleotide Sequence of SV40 DNA. - Nature. 273:113-20.
- 34.-Varshavsky, A., Bakagev, B. B., Chumackov, P. M., Georgiev, G. P. - (1976). Minichromosome of Simian Virus 40: Presence of Histone H1. Nucl. Acids Res. 3:2101-13.
- 35.-Tsubota, Y., Waqar, M. A., Burke, J. F., Milavetz, B. I., Evans, M. J., Kowalsky, D., Huberman, J. A. (1979). Association of Enzymes - with Replicating and Nonreplicating Simian Virus 40 Chromosomes. Simposia on Quantitative Biology. Vol. XLIII. pp. 693-704. G.S.H.L. U.S.A.
- 36.-Williams, K. R., Konigsberg, W. en Chirikjian, J. G., Papas, T. S. (1981). Gene Amplification and Analysis. Vol. 2. Ed. Elsevier North Holland. U.S.A.
- 37.-Delius, H., Mantell, N. J. (1972). Characterization by Electron Microscopy of the Complex Formed Between T4 Bacteriophage - Gene 32-Protein and DNA. J. Mol. Biol. 67:341-50.
- 38.-Brack, C., Bickle, T. A., Yuan, R. (1975). The Relation of Single-Stranded Regions in Bacteriophage PM2 Supercoiled DNA to the Early Melting Sequences. J. Mol. Biol. 96:693-702.
- 39.-Bittner, M., Burke, R. L., Alberts, B. M. (1979). Purification of

- the T4 Gene 32 Protein Free from Detectable Deoxyribonuclea
se Activities. The J. of Biol. Chem. 254:9565-72.
- 40.-Garvey, J.S., Cremer, N.E., Sussdorf, D.H. (1977). Methods in -
Immunology. Thd. Edition. Ed. W.A. Benjamin Inc. U.S.A.
- 41.-Palacios, R., Palmiter, R.D., Schimke, R.T. (1972). Identifica -
tion and Isolation of Ovalbumin Synthesising Polysomes. -
The J. of Biol. Chem. 247:2316-21.
- 42.-Weir, D.M. (1967). Handbook of Experimental Immunology. Ed.
Blackwell Scientific Publications. Great Britain.
- 43.-Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1982). Molecular Clo -
ning. A Laboratory Manual. Ed. Cold Spring Harbor. U.S.A.
- 44.-Hirt, B. (1967). Selective Extraction of Polyoma DNA from -
Infected Mouse Cell Cultures. J.Mol.Biol. 26:365-69.
- 45.-Burton, K. (1956). A Study of the Conditions and Mechanism
of the Diphenylamine Reaction for the Colorimetric Estima -
tion of Deoxyribonucleic Acid. Biochemical Journal. 62:315-
22.
- 46.-Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during
the Assembly of the Head of the Bacteriophage T4. Nature.
227:680-85.
- 47.-Laemmli, U.K., Cheng, S.M., Adolph, K.W., Paulson, J.R., Brown, J.A.,
Baumbach, W.R. (1977). Metaphase Chromosome Structure: The
Role of Nonhistone Proteins. Simposia on Quantitative Biolo -
gy. Vol. XLIII. pp.351-60. G.S.H.L. U.S.A.
- 48.-Hayat, M.A., (1970). Principles and Techniques of Electron -
Microscopy. Vol.1. Ed. Litton Educational Publishing Inc.
U.S.A.
- 49.-Dubochet, J., Docommun, M., Zollinger, M., Kellenberger, E. (1971).
A New Preparation Method for Dark-Field Electron Microscopy

- of Biomacromolecules. *J. Ultrastructure Res.* 35:147-67.
- 50.-Kleinschmidt, A.K. (1968). Monolayer Techniques in Electron Microscopy of Nucleic Acids Molecules. en *Methods in Enzymology*. Vol. XII. parte B. Ed. Academic Press. U.S.A.
- 51.-Bradford, M.M. (1976). Analytical Determination of Proteins. *Analytical Biochemistry.* 72:248-54.
- 52.-Bosales, R.L. (1984). Aporte a la Purificación de Genes Transcripcionales de Virus de Simio 40 (SV40). Tesis de Licenciatura. ENEP-Iztacala UNAM. México.
- 53.-Buckler, A.J., Krauss, M.R., Pigiet, V., Benbow, R.M. (1982). Asynchronous Bidirectional Replication of Polyoma Virus DNA. *J. of Virol.* 43:885-95.
- 54.-Formosa, T., Burke, R.L., Alberts, B.M. (). Purification of - Proteins Essential for T4 Bacteriophage DNA Replication - and Genetic Recombination on a 32 Protein Affinity Column. En Impresion.
- 55.-McCracken, A.A. (1982). A Temperatura Sensitive DNA Synthesis Mutant Isolated from the Chinese Hamster Ovary Cell - Line. *Somatic Cell Genetics.* 8:179-95.
- 56.-Spanos, G.R. (1981). Detection of the Catalytic Activities of DNA Polymerases and their Associated Exonucleases following SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Nucl. Acids Res.* 9:1825.
- 57.-Weaver, D.T., Fields-Berry, S.C., DePamphilis, M.L. (1985). The Termination Region for SV40 DNA Replication Directs the - Mode of Separation for the two Sibling Molecules. *Cell.* - 41:565-75.
- 58.-Waqar, M.A., Ruberman, J.A. Studies on Replicating Simian Virus

40 Chromosomes: Association with Thymidine Kinase. en -
Molineux, I., Kohiyama, M. (1978). DNA Synthesis Present -
and Future. Plenum Press. U.S.A.