



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

---

---

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
I Z T A C A L A

DETECCION DE LA ARN POLIMERASA II  
EN PLANTAS DE FRIJOL (Phaseolus vulgaris)

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 :  
EDGAR HILARION MEJIA RONQUILLO

Los Reyes Iztacala Edo. de Méx.

1988



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 la memoria de mi  
padre y hermano  
Antonio.

A mi madre y  
Hermanos

A mis compañeros

y amigos

ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO 24 DEL  
DEPARTAMENTO DE GENETICA Y BIOLOGIA MOLECULAR DEL  
CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL, BAJO LA ASESO-  
RIA DEL DR. PATRICIO GARIGLIO VIDAL.

## INDICE

	Página
ABREVIATURAS.....	i
RESUMEN.....	ii
INTRODUCCION.....	1
1) Control de la transcripción en eucariontes.....	6
2) ARN Polimerasas.....	10
OBJETIVOS.....	21
MATERIALES Y METODOS.....	24
1) Soluciones y reactivos.....	24
1) Pasaje de células.....	26
2) Formación de geles de poliacrilamida.....	26
3) crecimiento de plantas de frijol.....	28
4) Lisados totales de plantas de frijol.....	28
5) Extractos celulares.....	31
6) Conteo de células viables.....	31
7) Yodación de la proteína A.....	30
8) Transferencia de proteínas a filtros de nitrocelulosa.....	29
9) Inmunodetección de proteínas.....	29
9) Tinción de geles.....	32
RESULTADOS.....	34
1) Inmunodetección de la ARN polimerasa II de plantas- de frijol.....	34
2) Especificidad y sensibilidad de anticuerpos contra la ARN polimerasa, en ensayos con lisados totales de frijol y células HeLa.....	36
3) Inmunodetección de los polipéptidos de mayor peso molecular de la ARN polimerasa II de plantas de frijol	

y células HeLa.....	38
4) Una segunda interrogante fue ver si en realidad 220,000 d era el peso molecular de la subunidad mayor de la ARN polimerasa II de plantas de frijol.....	41
5) Posible degradacion proteolítica de la subunidad mayor de células HeLa por acción de proteasas de un extracto crudo de frijol.....	44
6) Efecto de inhibidores de proteasas sobre la estabilidad de la subunidad IIo en 3 horas de incubación a 4 C y 32 C.....	45
7) Añejamiento de la subunidad IIo de extractos totales de plantas y células HeLa .....	49
DISCUSION.....	55
BIBLIOGRAFIA.....	61



## ABREVIATURAS

ADN	.....	Acido desoxirribonucléico
ARN	.....	Acido ribonucléico
EDTA	.....	Etilendinitrilotetracetato
Disódico		
DTT	.....	Dithiothreitol
I125	.....	Iodo 125
PMSF	.....	Fenil metilsulfonil fluoruro
mCi	.....	milicuries
SDS	..	Dodecil Sulfato de Sodio
TEA	.....	Trietanolamina
TEMED	.....	N, N, N'N' Tetrametilendiamino
H2O2	.....	Peróxido de Hidrógeno
$\mu$ l	.....	Microlitros
HRP	.....	Reactivo de Raíz acoplado a Peroxidasa.
AL	.....	Amortiguador de Lavado
BSA	.....	Albúmina Sérica de Bovino
APS	.....	Persulfato de Amónio
PBS	.....	Amortiguador de Fosfatos

## RESUMEN

La ARN polimerasa II es responsable de la síntesis de ARN mensajero en organismos eucariontes. Algunas preparaciones de esta enzima presentan tres formas llamadas IIO, IIA y IIB. Las cuales difieren en el peso molecular de la subunidad mayor, IIO (240 Kd), IIA (214 Kd), IIB (180 Kd).

Los objetivos del presente estudio fueron detectar y analizar la estructura molecular de la subespecie de la ARN polimerasa en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*). Además de examinar las condiciones que de alguna manera intervienen en la estabilidad de la estructura molecular de las distintas formas de esta enzima.

Encontramos que el péptido de mayor peso molecular de la ARN polimerasa II correspondiente a la planta del frijol, es de 220 Kd, mientras que para células HeLa es de 240 Kd para su péptido de mayor peso molecular de acuerdo a lo reportado por Dahmus (1981). Así mismo vemos que en tiempos cortos (de 0 a 1 hora a 32 C) no existe una reducción de la subespecie IIO contrario a lo reportado por Dahmus y Guilfoyle (1975).

Observamos también que durante un añejamiento en presencia de inhibidores (SMIF 2mM) existe una ligera disminución de IIO. No obstante no observamos un incremento de IIA debido a la disminución de IIO.

## INTRODUCCION

Una de las mayores dificultades que se presentan al abordar el estudio del genoma en organismos eucariontes, es su elevado nivel de complejidad. En dichos organismos el ADN lleva la información en forma codificada (secuencia de nucleótidos) y constituye el material genético de las células; en las células eucarióticas el ADN no se encuentra libre sino formando complejos con proteínas (histonas y no-histonas) que dan lugar a una estructura llamada cromatina (esta estructura debe su nombre al hecho que se tiñe fuertemente con colorantes básicos) en los núcleos de estos organismos durante la interfase.

Los diferentes estadios estructurales de la cromatina han sido relacionados con los términos heterocromatina y eucromatina. En su origen estos términos se emplearon para designar cromosomas completos. Los cromosomas sexuales se denominan heterocromosomas. En la actualidad la heterocromatina se define en base a tres criterios; condensación permanente durante la interfase, inactividad genética y replicación tardía durante la fase S. Por otro lado la eucromatina esta formada por la cromatina transcripcionalmente activa a pesar de que la mayoría de ella es activa solamente durante períodos cortos en la vida de la célula.

Uno de los mayores impedimentos en el estudio de la relación entre estructura y función de la cromatina radica en el hecho que la mayoría de los cromosomas son visibles al microscopio óptico cuando la cromatina esta inactiva e invisibles cuando algunas regiones de ella se encuentran activas. La cromatina está

constituida por tres macromoleculas distintas: ADN, ARN y proteinas. Las proteinas representan más de la mitad del peso de la cromatina y se dividen en dos grupos: histonas y no-histonas.

La relación entre histonas y ADN es de un microgramo de ADN / microgramo de proteína y se encuentra muy conservado. Las histonas estan representadas por un grupo de cinco proteínas de bajo peso molecular con carácter básico y cuyo patrón es casi invariable entre distintos organismos, tejidos y estadíos del ciclo celular. Las histonas han sido denominadas: H1 (S), H2A, H2B, H3 y H4.

Las no-histonas por otra parte, estan representadas por una gran variedad de proteinas (aproximadamente 450 distintos polipéptidos), entre los que se encuentran las enzimas involucradas en el metabolismo de los acidos nucleicos (ARN polimerasas, ADN polimerasas, etc.), proteinas que intervienen especificamente en la regulación de ciertos genes y aquellos que intervienen en la organización de niveles superiores de la compactación de la cromatina.

Las histonas junto con el ADN forman la unidad básica de la cromatina. En 1974 Kornberg postuló que la estructura básica de la cromatina estaba constituido por un octamero de histonas y doscientos pares de bases de ADN. El octamero de histona formado por H2A, H2B, H3 y H4 en realidad está integrado por un tetramero fuertemente unido (H3-H4), y por dos dimeros 2 (H2A-H2B) (1). La fibra de cromatina esta formada por unidades repetidas llamadas

nucleosomas (2) las cuales forman una cadena flexible unida por pequeños segmentos de ADN.

Luego de digerir la cromatina con nucleasa micrococcal se obtienen partículas derivadas de los nucleosomas llamadas partículas centrales, las cuales contienen al octamero de histonas y solamente 140 pares de bases de ADN (3). El ADN restante que une a los nucleosomas entre si, se denomina ADN espaciador.

Es posible que la quinta histona (H1) sea uno de los factores que controlen la expansión y contracción cromosómica durante el ciclo mitótico, como también de la cromatina interfásica durante la diferenciación celular.

Se tienen evidencias que sugieren que el ADN se encuentra envolviendo al octámero de histonas, es decir que se enrolla por fuera de la partícula (4), (5), (6) dándole dos vueltas.

El primer nivel de compactación del ADN resulta en una fibra nucleosomal que es una cadena de 10 nm de espesor. El grado de compactación del ADN en esta fibra comparado con la forma lineal es de cerca de seis veces. Los niveles superiores de organización de la cromatina se generan mediante el enrollamiento de la fibra nucleosomal básica. El segundo nivel de compactación resulta así en una fibra de 25 a 30 nm consecuencia del enrollamiento helicoidal de la fibra básica.

A pesar de la gran variedad de complejidad de los cromosomas eucariotes, todo ello mantiene una simplicidad y uniformidad en

la manera que organizan el ADN con las histonas para formar la fibra nucleosomal. La cromatina existente tanto en los cromosomas metafásicos como en el núcleo durante la interfase se encuentra organizada de manera nucleosomal en todos los organismos estudiados.

Existen varias evidencias que sugieren que el ADN de los cromosomas eucarióticos se encuentra formando asas o dominios. El trabajo clásico de Paulson y Leamlí (1977) (7) mostró que los cromosomas en metafase al ser tratados para remover la totalidad de las histonas presentan una estructura central o esqueleto al cual se anclan halos de ADN que forman asas de 10-30 nm de largo. Otra línea de trabajo que apoya la idea de que el ADN de los cromosomas eucariotes se encuentra formando asas o dominios, la constituyen los estudios del genoma interfásico intacto de *Drosophila* (8) y el estudio de los halos de ADN anclados a la matriz nuclear en células 3T3 (9).

En la cromatina existen además de las histonas una gran variedad de proteínas denominadas no histonas. Estas proteínas representan el 60-70% del contenido de las histonas. En este grupo se encuentran toda la variedad de enzimas involucradas en los procesos de replicación y transcripción así como en la modificación post-transcripcional de las histonas, además de aquellas responsables de la modulación de la expresión genética y las involucradas en los diferentes niveles de organización de la cromatina. Tanto durante la interfase como durante la división celular.

Al analizar la fracción de proteínas no-histonas provenientes de células HeLa en un sistema de electroforésis bidimensional, es posible contar alrededor de 470 proteínas diferentes (10) (11).

Estudios recientes han apoyado la idea de que algunos de estos componentes de la estructura celular principalmente actina, se encuentran asociados a la cromatina durante la interfase (12).

Las proteínas no histonas extraídas de la cromatina con 0.35M NaCl forman un grupo que es soluble en TCA 2% cuyos miembros tienen peso molecular menor de 30,000 d y que se conoce como HMG (proteínas de alta movilidad) (13).

Se conocen alrededor de 20 proteínas distintas de este grupo, de las cuales 4 han sido caracterizadas: HMG1, HMG2, HMG14 y HMG17. Se ha mostrado que HMG14 y HMG17 tienen afinidad por ADN de cadena sencilla (14) y que se encuentran asociadas a la partícula central de los nucleosomas, por lo que se ha sugerido, juegan un papel en la organización de la cromatina, a nivel nucleosomal (15).

## CONTROL DE LA TRANSCRIPCIÓN EN ORGANISMOS EUCARIOTES

Existen evidencias actualmente que demuestran que la regulación de la expresión genética se ejerce principalmente a nivel de la transcripción (16). La expresión genética se lleva a cabo por distintos eventos; cada uno de los cuales está sujeto a distintos niveles de regulación. En un principio se sintetiza una molécula precursora de ARN en el proceso denominado transcripción. Esta molécula entonces se procesa para dar como resultado un ARN maduro, el cual es transportado a citoplasma para finalmente ser traducido y generar la proteína correspondiente.

La idea de que cada fenotipo celular resulte de la expresión diferencial de un grupo particular de genes se apoya en diversas observaciones, tales como el hecho de que durante el desarrollo no existe pérdida de genes que no se expresan, ni amplificación de aquellos que sí lo hacen. Aunque esto significa que el contenido genético no cambia mayormente, no excluye la posibilidad de que existan variaciones en el arreglo de secuencias entre los distintos fenotipos.

El concepto de la expresión genética diferencial se apoya muy fuertemente en el hecho de que cada tipo celular presenta un patrón característico de moléculas de ARN mensajero.

Se conoce bien la existencia en el núcleo, de moléculas de ARN con tamaño muchas veces mayor que el mensajero. El procesamiento de los grandes precursores de RNA



(heteronucleares), se realiza únicamente en el núcleo e involucra 3 tipos de actividades: el corte y el empalme (Splicing) de las regiones codificadoras llamadas exones para eliminar las secuencias espaciadoras llamadas intrones, la metilación en el extremo 5' que genera el llamado CAP, y finalmente la adición en el extremo 3' de una secuencia de poli-A (17).

Hay varios factores que regulan la velocidad transcripcional de los genes, podemos mencionar entre ellos:

- estructura de la cromatina
- metilación del ADN
- modificación de histonas (principalmente acetilación)
- hormonas
- ARN polimerasas

Un ejemplo de la relación entre la estructura de la cromatina respecto a la velocidad transcripcional de los genes es la región promotora, y la actividad transcripcional, lo representa la región GAP en micromosomas de SV40. Esta región (presente en 30% de los micromosomas virales) contiene, tanto el origen de replicación como los promotores (temprano y tardío) de la transcripción.

Existen evidencias que apoyan la idea que existen cambios en la forma de organización de genes activos. El trabajo clásico de Weintraub y Boudine 1978 (18) mostró que los genes de globina en núcleos de endoblastos de pollo son más sensibles a digestión por ADNasa I.

La sensibilidad a la digestión por ADNasa I ha sido observada también en diferentes clases de genes en oviducto, que son transcritos con distinta frecuencia. La sensibilidad del gene ovoalbúmina permanece aún cuando la expresión del mismo ha cesado como consecuencia de la supresión del estímulo hormonal (19).

Parece que la sensibilidad preferencial a la digestión por ADNasa I es una característica de todos los genes sujetos a transcripción es decir, existe correlación entre dicha sensibilidad y la capacidad del gene para ser transcrito en algún momento de la vida de la célula Weinsbrod y Weintraub (1979) encontraron que el tratamiento de nucleos de eritrocitos de embrión de pollo con ADNasa I, libera dos proteínas que son liberadas luego de la digestión con nucleasa estafilococal. Estas proteínas corresponden posiblemente a las proteínas de alta movilidad HMG14 y HMG17. Se sugiere que ellos sean en parte responsables de conferir la sensibilidad preferencial de los genes activos a la digestión por ADNasa I ya que su adición a una cromatina depletada de ellos, restaura la sensibilidad perdida.

Se ha propuesto que la acetilación de histonas (principalmente H4) pudiera estar involucrada en la activación transcripcional de regiones de cromatina. Se ha reportado la asociación preferencial de la histona H4 acetilada con regiones activas en la cromatina (20). Sin embargo, la acetilación de histonas no es suficiente para conferir mayor sensibilidad de la cromatina a la digestión por ADNasa I.

El aparato transcripcional responsable de la producción de los ARN heteronucleares es muy complejo. Las enzimas responsables de la síntesis de los transcritos primarios son las ARN polimerasas las cuales deben jugar un papel primordial en los mecanismos que controlan la transcripción (ver anteriormente).

Los trabajos pioneros de Weiss, con núcleos de células de mamífero (21), mostraron por vez primera, la presencia de actividad de ARN polimerasa, dependiente de ADN, en núcleos de hígado de rata.

La mayoría de los estudios realizados hasta 1969 utilizaron núcleos aislados o preparaciones de cromatina (enzima agregada) para investigar la actividad de la enzima bajo distintas condiciones, debido a la falta de metodologías adecuadas para solubilizar a la enzima que se encuentra unida fuertemente a la cromatina.

En la actualidad se utilizan básicamente 3 metodologías para solubilizar a la enzima de su templado de cromatina: incubación de núcleos en amortiguadores de distinta fuerza iónica a 4 °C, sonicación a baja fuerza iónica y sonicación en alta fuerza iónica.

El análisis de la actividad enzimática se realiza en presencia de un catión divalente, generalmente  $Mg^{++}$  o  $Mn^{++}$  y normalmente se emplea uno de los nucleótidos trifosfato marcado radioactivamente para seguir la síntesis del ARN.

Las purificaciones tradicionales incluyen sonicación de los núcleos aislados, precipitación de los ácidos nucleicos y separación de las distintas especies enzimáticas en diversas cromatografías como DEAE-Sephadex, fosfocelulosa y heparina agarosa principalmente.

Los mayores rendimientos de enzima reportados han sido obtenidos de germen de trigo, levadura y timo de ternera (22). Los trabajos de Widnell y Tata (23, 24) sugirieron la existencia de distintas especies de ARN polimerasa en los núcleos de células animales. Encontraron que a baja fuerza iónica y en presencia de  $Mg^{++}$ , los núcleos sintetizaban un ARN rico en G-C semejante al ARN ribosomal (ARNr), mientras que en presencia de  $Mn^{++}$  y alta fuerza iónica, los núcleos sintetizaban un ARN más heterogeneo, con una composición semejante al ADN no nucleolar.

La observación de Stirpe y Fiume (25) que la alfa amanitina; una toxina del hongo *Amanita phalloides*, inhibía específicamente la actividad de ARN polimerasa de núcleos de raton incubados en alta fuerza iónica, sugería fuertemente la existencia de distintas especies de la enzima ARN polimerasa en los núcleos de células animales.

En 1969 Roeder y Rutter (26) reportaron la separación y purificación parcial mediante cromatografía, de 3 especies de la ARN polimerasa, luego de solubilizarlas de núcleos mediante sonicación en alta fuerza iónica.

La nomenclatura empleada las designa I, II y III dependiendo de su orden de elución de una cromatografía en DEAE-sephadex. Basandose en su sensibilidad de las enzimas a la alfa amanitina, Kedinger et. al. (27) clasificaron en A, B y C a las distintas actividades de acuerdo a su sensibilidad a esta toxina. Las de tipo A aquellas sensibles a la toxina, las de tipo B muy

sensibles a concentraciones bajísimas de la toxina ( $10^{-10}$  M) y los tipos C sensibles a concentraciones más altas de esta droga ( $10^{-6}$  M).

Actualmente se conocen tres tipos distintos de ARN polimerasa en eucariontes que difieren en su composición, localización y función.

La ARN polimerasa I (A), se localiza en el nucleolo, no es inhibida por elevadas concentraciones de alfa amanitina y es la responsable de la síntesis de los ARN ribosomales (ARNr). La ARN polimerasa II (B), es la responsable de la síntesis de los ARN heteronucleares, es muy sensible a concentraciones muy bajas de alfa amanitina ( $10^{-10}$  M) y su actividad se localiza en el nucleoplasma. Por su parte la ARN polimerasa III (C) se localiza en el nucleoplasma, se inhibe por concentraciones intermedias de alfa amanitina ( $10^{-6}$  M) y es responsable de la síntesis de pequeños ARN de transferencia (ARNt) y 5s ribosomal.

Estas distintas especies han sido aisladas y purificadas a partir de plantas (36), hongos (28), protistas (29) y mamíferos (30).

A pesar de que las tres distintas especies mencionadas anteriormente presentan subunidades de bajo peso molecular comunes a ellas (29) (31), la estructura de cada especie es diferente debido a la presencia de polipéptidos de alto peso molecular exclusivos de cada especie (ver más adelante).

La ARN polimerasa II responsable, de la síntesis de ARN mensajero, ha sido aislada de una gran variedad de organismos y generalmente presenta cerca de 10 subunidades aproximadamente. Se ha estimado un peso molecular de 500 Kd o un gradiente de sedimentación de 15S para ella. La estructura de la ARN polimerasa II purificada de timo de ternera, analizada mediante electroforesis en presencia de SDS, se presenta en la Fig.1. En esta se observan aproximadamente 10 subunidades; 3 de alto peso molecular (mayores de 100,000 d) y el resto con pesos moleculares menores de 50,000 d.

En realidad los polipéptidos que se observan representan una mezcla de 3 subespecies de la enzima (ver fig. 2). Existen diversas evidencias que apoyan fuertemente la idea que la ARN polimerasa II de plantas y de mamíferos está formada por 3 subespecies llamadas IIO, IIA y IIB (32, 33, 34, 35). En la figura 2 se muestra una reproducción esquemática de estas 3 subespecies.

Como puede observarse en la figura 1 y 2 la mayoría de los componentes de las distintas subespecies son comunes; la única diferencia entre ellas consiste en el tamaño del péptido de mayor peso molecular que es distinto para cada una de ellas. La subespecie IIO tiene un polipéptido de 240 Kd (llamado IIO), IIA uno de 214 Kd (IIA) y IIB uno de 180 Kd (IIB), que son exclusivos para cada una de ellas. El resto de las subunidades, incluyendo al polipéptido de 140 Kd son comunes para las distintas subespecies de la ARN polimerasa II.

## RNA POLIMERASA II

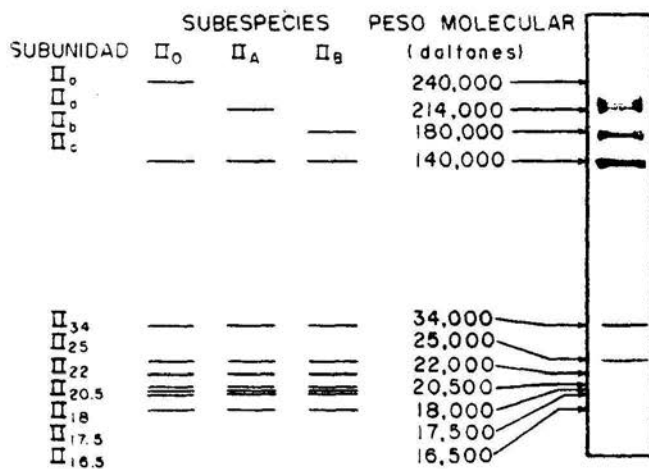


fig. 1



La ARN polimerasa II purificada de diferentes organismos muestra siempre la misma heterogeneidad en el péptido de mayor peso molecular que presentan las 3 subespecies (27, 28, 29, 30, 34, 35, 36, 37).

En la mayoría de las preparaciones, esta enzima purificada presenta principalmente las subespecies IIA y IIB.

Se ha mostrado que estas dos subespecies tienen la misma actividad específica en un ensayo de transcripción inespecífica "in vitro" (38).

Por el contrario, recientemente Dahmus y Kedinger (39) reportaron, que anticuerpos monoclonales contra las subespecies IIA/IIB inhiben completamente la iniciación específica de la enzima en un ensayo de transcripción "in vitro", utilizando tanto el promotor tardío de adenovirus 2, como los promotores celulares de ovoalbúmina y conalbúmina.

Se ha sugerido (40), que la subunidad mayor (IIo) sea la única codificada en el genoma y que las subunidades mayores de las otras 2 subespecies (IIA y IIB) se originan por procesamiento proteolítico específico. El origen proteolítico de la subunidad mayor de la subespecie IIB a partir de la IIA ha sido reportado en levaduras (41), *Drosophila* (42) y plantas (43).

Recientemente, Guilfoyle y col. (44) analizaron la heterogeneidad en el tamaño de la subunidad mayor de la enzima en plantas. Utilizaron anticuerpos específicos que reconocen las subunidades mayores de la enzima. Encontraron que los

## RNA POLYMERASE II SUBSPECIES

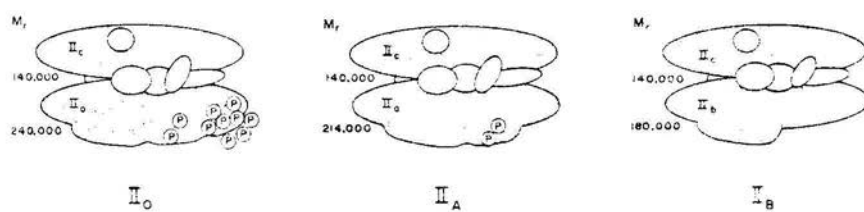


fig. 2

procedimientos tradicionales de purificación resultan en la conversión del polipéptido de 220,000 d Iia a la forma Iib (180,000 d). Al utilizar núcleos aislados, observaron que el polipéptido de 220,000 d se encuentra protegido del ataque proteolítico de igual forma observaron que si la purificación se realiza utilizando amortiguadores con PH alcalino (PH 9), la proteólisis se retarda. Estos datos sugieren que la subunidad mayor es demasiado sensible al ataque por proteasas y que la forma Iib se origina durante las purificaciones debido a la proteólisis (44).

Diversas evidencias de tipo inmunológico (45, 46, 47) apoyan la idea del origen proteolítico de las unidades mayores de las subespecies Iia y Iib. El origen proteolítico de Iia y Iib se apoya también en análisis bidimensional de mapas de huella dactilar de las subunidades de alto peso molecular de ARN polimerasas de diversas fuentes. Link et al (48), utilizando enzima purificada de perejil encontraron que los mapas generados por los polipéptidos correspondientes a Iio, Iia y Iib son muy similares mientras que aquel obtenido a partir de Iic es diferente. Del mismo modo, Dahmus (39) reportó que los mapas obtenidos de Iia y Iib son muy parecidos y difieren del obtenido a partir de Iic.

A pesar de que el origen proteolítico de las subunidades Iia y Iib se encuentra apoyado fuertemente el hecho que dicha proteólisis tenga un significado fisiológico no ha sido aclarado.

Existen evidencias recientes que sugieren que la subunidad más grande de la enzima purificada (es decir IIa) presenta afinidad por ADN (49, 50). Carrol y Stollar (49) obtuvieron anticuerpos monoclonales contra la enzima de timo de ternera y observaron que eran capaces de inhibir su actividad. Al analizar la naturaleza del efecto inhibitorio, encontraron que dicha inhibición era debida a una competencia por el templado; es decir, que los anticuerpos reconocen una región de la enzima que se encuentra involucrada en la interacción con el ADN. En análisis, el filtro de nitrocelulosa de la subunidad reconocida por los anticuerpos mostró que era la de 214,000 d.

Los trabajos de Sariglio y col. (51, 52) han mostrado que la actividad de ARN polimerasa II presente en núcleos de ratón, puede ser incrementada cerca de 10 veces mediante la adición del detergente aniónico Sarkosil. El Sarkosil causa la liberación de la gran mayoría de proteínas asociadas a la cromatina, incluyendo la totalidad de histonas y la mayoría de las no-histonas, pero no libera a la ARN polimerasa que ha iniciado la transcripción "in vivo". Se conoce que el Sarkosil inactiva completamente a la enzima soluble (51). El incremento en la ARN polimerasa II resultado de la adición del Sarkosil, se debe principalmente a una mayor tasa inicial de síntesis y a una prolongación de la reacción de la enzima con un incremento paralelo en el tamaño de las cadenas de ARN.

En los organismos eucariotes, se conoce la existencia de dos poblaciones distintas de ARN polimerasa. Los trabajos de Yu

(53) han mostrado que la ARN polimerasa existe en dos estados funcionales dentro del núcleo en células de hígado de rata. La ARN polimerasa "asociada a la cromatina", que es activa con el templado endógeno y se inhibe en presencia de actinomicina D y por otra parte, la ARN polimerasa "libre", que es inactiva con la cromatina endógena y puede ser detectada utilizando templados sintéticos exógenos como por ejemplo poli (dT-dC) o poli (dA-dT), luego de inhibir la población de enzima asociada.

Actualmente en nuestro laboratorio García Carranca y Miguel Cruz (55) trabajando células CV1 y minicromosomas de SV40 demostraron que Ito es la especie enzimática involucrada en el evento de iniciación encontrando que la proporción de Ito en ligados totales y núcleos aislados de CV1 es elevada (mayor del 70%). Indicando que la mayor proporción de la enzima en estas células está representada por Ito.

Por otro lado Rangel L. y col. (54) trabajando con células HeLa encontraron que los niveles de Ito disminuían después de la infección con poliovirus, siendo esta la encargada de la transcripción específica, esto sugiere que la inhibición de la transcripción ocurre a nivel de la iniciación.

En 1976, Greenleaf y Bautz (42) empleando anticuerpos policlonales contra la ARN polimerasa II en larva de *Drosophila melanogaster*, encontraron un efecto inhibitorio sobre la actividad de la enzima purificada a partir de *Drosophila*, levadura y tipo de ternera. Los anticuerpos policlonales contra la ARN polimerasa II de *Drosophila* inhiben no solo su actividad

sino también la de sus análogos en levadura y timo de ternera sugiriendo la conservación de la enzima en la escala evolutiva (42).

## OBJETIVOS

Los objetivos del presente trabajo fueron la detección de las distintas subespecies de mayor peso molecular de la ARN polimerasa II. Así como la estabilidad de la estructura molecular de la ARN polimerasa II en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*).

Se trabajó con plantas de frijol por dos razones principalmente: Una de ellas por la facilidad de manejo y cultivo de la planta, además de su importancia económica, por otro lado sabiendo que es importante el estudio de los mecanismos que regulan la transcripción de los genes eucarióticos permitiendo así entender no solo como crecen se diferencian y envejecen los distintos tejidos de un organismo, sino también como se pierde el control de la transcripción de ciertos genes para dar origen a enfermedades tales como cáncer humano; nuestro objetivo es entender el proceso denominado transcripción, debido a ello y utilizando una biblioteca genómica de frijol generosamente prestada por el doctor Luis Herrera Estrella de la unidad Irapuato, nosotros nos propusimos rastrear el gen que codifica para la ARN polimerasa II de la planta del frijol. De esta manera obteniendo el gen ayudará a entender muchas cosas oscuras del proceso transcripción.

- Examinar las condiciones que mantienen la estabilidad de las distintas subespecies de la ARN polimerasa II.

- Ensayos preliminares para la obtención del gen que codifica para la ARN polimerasa II.

Para lograr estos objetivos fué necesario cumplir algunos objetivos intermedios:

1. Separar e identificar los polipeptidos correspondientes a las subunidad (IIc, IIa y IIb) de la ARN polimerasa II de lisados totales de frijol.

2. Incubar y añejar a 4 y 32 C con diferentes amortiguadores conteniendo o no inhibidores de proteasas.

3. Mezclando extractos de lisados totales tanto de células HeLa como de frijol.

4. Rastreo del gen mediante la utilización de anticuerpos policlonales en filtros de nitrocelulosa conteniendo proteínas sobre-expresadas del ADN de una biblioteca genómica.

Para cubrirlos fué necesario seguir la siguiente metodología:

- Cultivo de células HeLa.
- Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS.
- Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS.
- Transferencia de proteínas de gel a papel de nitrocelulosa.



- Inmunodetección de las subunidades de la ARN polimerasa II en filtros de nitrocelulosa y reacción con anticuerpos específicos contra la enzima purificada de timo de ternera producidos en conejos; dichos anticuerpos se usan como prueba directa para determinar la composición de la enzima en nuestros sistemas.

- Para visualizar estos complejos enzima-anticuerpo se uso  $^{125}\text{I}$  proteína A que se une a la fracción fc de los anticuerpos o bien un segundo anticuerpo de chivo contra conejo acoplado a peroxidasa y revelado con reactivo de desarrollo de color.

## MATERIAL Y METODOS

- Amortiguador de Transferencia (3 lt): 25 mM Tris Base/ 92 mM Glicina/ 20% (v/v) Metanol.
- A25: 50mM Tris-HCl (pH:7.9)/ 0.1 mM EDTA/ 0.2 mM DTT/ 25% Glicerol.
- Amortiguador de Lavado (W.B.): 10 mM Tris-HCl (pH:7.4)/ 0.5% Triton X-100/ 0.2% SDS/ 150 mM NaCl.
- Amortiguador para electroforesis: 25 mM Tris-Base/ 192 mM Glicina/ 0.1% SDS.
- Solución de Coomassie: 0.25% Azul Brillante de Coomassie R-250/ 4% Metanol/ 9% Acido Acético.
- Solución desnaturalizante (6X): 375 mM Tris-HCl (pH:6.8)/ 12% SDS/ 30% 2-mercaptoetanol/ 12% Glicerol/ 0.02% Azul de Bromofenol. •
- Solución Deterioradora: 45% Metanol/ 7.5% Acido Acético.
- Amortiguador de Fosfatos (PBS): Sol. Fosfatos (pH:7.4)/ 150 mM NaCl/ 10% Glicerol.
- Solución de Fosfatos: 0.5 M fosfato diácido de potasio / 0.5 M fosfato disódico.
- Amortiguador de Tris Salino (TBS): 20 mM Tris-HCl (pH:7.5)/ 0.5 M NaCl.

- Amortiguador "B" : 25 mM Tris-HCL (pH:7.9) / 2 mM EDTA / 1 mM DTT / 0.2 mM PMSF.

- Amortiguador "A" : 25mM Tris-HCL (pH:7.9 / 2mM EDTA / 1mM DTT / 2mM PMSF / 1mM N-Ethylmaleimida / Leupeptina.

- Amortiguador "C" : 25mM Tris-HCL (pH:7.9 / 2mM EDTA / 1mM DTT.

## PASAJE DE CELULAS

Las células de la línea celular HeLa como las CV-1 fueron crecidas en monocapa se lavaron dos veces con PBS, después se agregaron 4ml de tripsina (0.05%) por caja p100 para despegar las células. A continuación estas se recuperaron en un tubo cónico de 50 ml al que previamente se agregó 1 ml de suero fetal de ternera y se sometió a centrifugación a 3000 rpm durante 5 min. Posteriormente la pastilla fue resuspendida en medio completo (con suero y antibioticos); medio MEM (cels. HeLa) y medio Eagle modificado por Dulbecco (cels. CV-1). Se tomaron alícuotas para la concentración requerida ( $3 \times 10^6$  cels./caja p100).

## FORMACION DE GELES DE POLIACRILAMIDA

Los geles de poliacrilamida-SDS en gradiente se prepararon según la técnica descrita por Laemmli (1970) (34). Los geles consistieron de acrilamida-bisacrilamida (30:0.8) con 30% Glicerol. Las concentraciones finales del gel separador fueron: 375 mM Tris-HCl (pH: 8.8), 0.01% SDS, 0.025% TEMED, 0.025% APS. La concentración de acrilamida fue de 17.5% y 5%. Después de la polimerización del gel separador, se añadió el concentrador con acrilamida al 3% y una concentración final de 125 mM Tris-HCl (pH: 6.8) / 0.01% SDS / 0.025% TEMED / 0.025% PSA. La electroforesis se corrió a 160 volts durante 18 horas, o hasta que el colorante alcanzó el borde del gel.

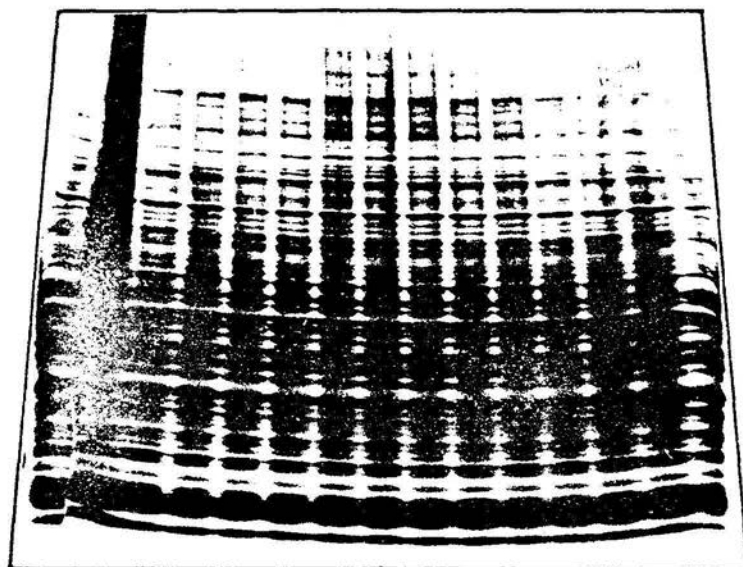


Fig. 4

Patrón electroforetico de un extracto total de la planta del frijol .

## CRECIMIENTO DE PLANTAS DE FRIJOL

Las semillas fueron germinadas sobre vermiculita húmeda a 28°C, durante 5 días, en presencia de hipoclorito de sodio al 0.1%.

## LISADOS TOTALES DE PLANTAS DE FRIJOL

Las plantas con 5 días de crecimiento fueron homogenizadas (10 g) con un politrón (brinkman instruments) o un mortero en 30 ml de amortiguador "B", posteriormente se filtró en 6 capas de gasa estéril. Después de la homogenización por 2 minutos se congela una alícuota para ser el tiempo 0, las demás muestras se dejan incubar a temperatura de 4°C o 32°C en diferentes tiempos. Algunas muestras de los extractos contenían inhibidores de proteasas. Los extractos se realizaron a temperatura de cuarto frío 4°C.

## TRANSFERENCIA DE PROTEINAS A FILTRO DE NITROCELULOSA

Al concluir la electroforesis, los geles se guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de realizar la transferencia. Se lavó el gel dos veces durante 30 minutos con el amortiguador de transferencia (Towbin y col.1979). El papel de nitrocelulosa se lavó de 10 a 15 minutos con el buffer de transferencia. El gel y el filtro de nitrocelulosa fueron colocados entre dos filtros whatman 3MM, el filtro de nitrocelulosa siempre colocado del lado del ánodo (+). La transferencia se efectuó a  $4^{\circ}\text{C}$  en atmósfera fría (con hielo seco y etanol) con un voltaje inicial de 150 a 200 volts y 400 miliampers aproximadamente, durante 5 horas.

## INMUNODETECCION DE PROTEINAS

Después de ser transferidos los filtros de nitrocelulosa, se bloquearon con albúmina al 3% disuelta en 15 ml de amortiguador de lavado 1X durante toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente el filtro se incubó con el primer anticuerpo (dirigido contra la ARN polimerasa II de Timo de Ternera) en 10 ml de albúmina 1% en PBS por tres horas, después se lavó tres veces en A.L. (10 min. cada). A continuación se incubó por dos horas con proteína A-I125 o anticuerpo de chivo anti-inmunoglobulinas de conejo acoplado a peroxidasa en albúmina al 1% en A.L. Cuando se incubó con proteína A-I125 se dieron 6 lavadas con cambios cada 10 min., el papel se envolvió con plástico adhesivo y se expuso con película Kodak X Omat AR a  $-80^{\circ}\text{C}$

C. En el caso de anticuerpo de chivo anticonejo acoplado a peroxidasa este se reveló siguiendo técnica descrita en el instructivo al producto (Bio-Rad, 1984). Dicha técnica consistió en el revelado del filtro inmediatamente después de terminar los lavados. La solución reveladora se preparó pesando 60 mg de Peroxidasa de rábano (HRP) en un tubo perfectamente seco. En un matraz se pusieron 100 ml de TBS (pH:7.5). Se disolvió el HRP en 20 ml de metanol e inmediatamente se agregaron 0.02 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% al TBS, para agregar ahí la solución de HRP. La mezcla se colocó en un recipiente donde el filtro fue sumergido. Luego de la aparición de las bandas se lavó el papel con agua bidestilada y se guardó en la oscuridad a 4°C.

#### MODIFICACION DE LA PROTEINA A

Esta se realizó en un volumen final de 0.3 ml. Se preparó una columna de 0.7x15 cm con Sephadex G-10 equilibrada con TEA (50 mM; pH:8). Por otro lado en un tubo de vidrio se mezclaron: TEA 50 mM, 0.1 M HCl, 1 mCi I-125 y 25 µg de proteína-A. A un tubo "soda-lime" se le agregaron 20 µl de una solución (1.8 mg Indogen/ml de cloroformo) y se evaporaron con nitrógeno gaseoso distribuyéndolo uniformemente por las paredes del tubo. La mezcla antes mencionada se incubó en hielo durante 15 min. con agitación constante. Después se agregaron 5 µl de 2-mercaptoetanol al primer tubo donde se realizó la mezcla (para detener la reacción), la mezcla se regresó a este tubo, en seguida se mezcló bien y se vertió en la columna de Sephadex G-10. Se colectaron 8



fracciones de 20 gotas cada una, que fueron eluidas con TEA. Se contaron 2  $\mu$ l de cada fracción en un contador gama para localizar la proteína-A Iodada.

#### EXTRACTOS CELULARES

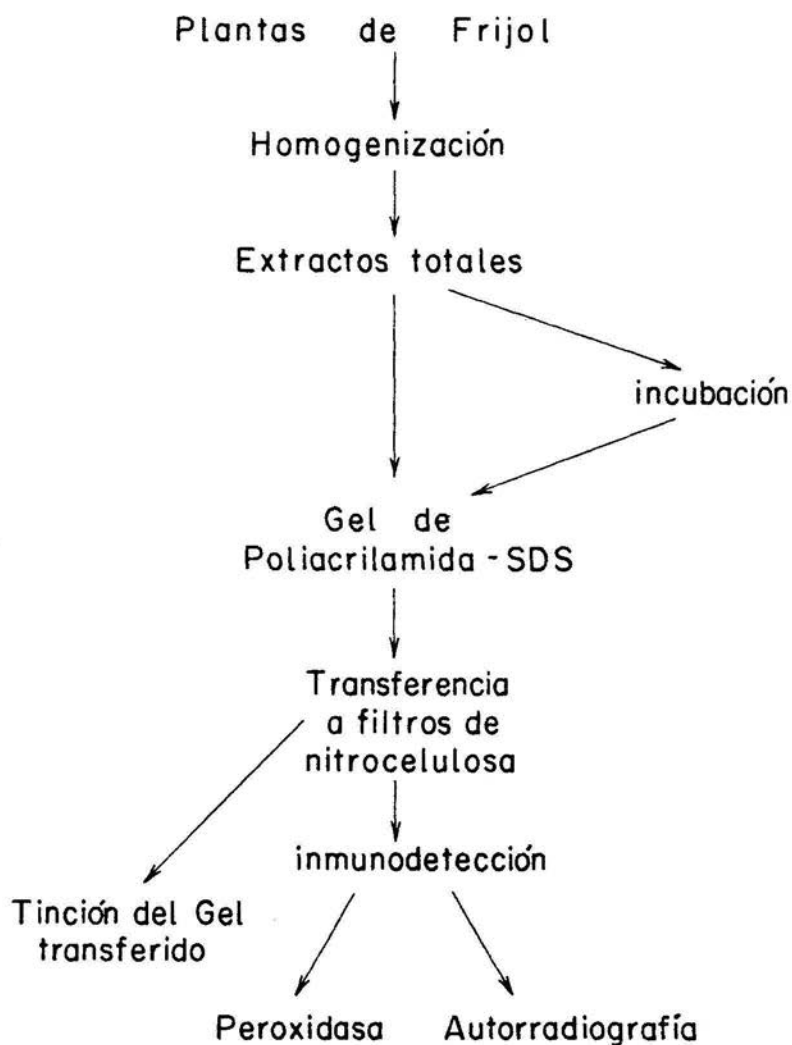
Las cajas confluentes p100 con células Hela (10X10 ) se lavaron con 1 ml de amortiguador "B", con un segundo mililitro se removieron las células con ayuda de un gendarme de hule, las alícuotas pueden ser congeladas hasta su uso.

#### CONTEO DE CELULAS VIABLES

Las células viables pudieron ser identificadas mediante el empleo del colorante azul de tripano (según las recomendaciones del proveedor "Gibco"). La técnica se basó en la capacidad de las células para excluir el colorante. El protocolo que se empleo es el siguiente: Las células en monocapa se resuspendieron con medio MEM (Medio Esencial Mínimo) para obtener una dilución  $1 \times 10^6$  o  $2 \times 10^6$  cels. por ml) en un tubo 12X75 mm. Agregar 0.1 ml de Azul de Tripano al 0.4% y mezclar perfectamente. Permitir la tinción por 5 minutos y no más de 15 minutos. Las células se contaron en una cámara hemocitómetro, se hizo un conteo de las células totales y de las células desteñidas. Asumiendo que las células vivas están desteñidas, se expresó en porcentaje de viabilidad.

## TINCION DE GELES

Una vez concluída la electroforesis los geles fueron teñidos con una solución de Coomassie durante 2 horas, posteriormente el exceso de colorante fue eliminado al incubarlos durante una hora con la solución desteñidora realizando varios cambios de la misma, posteriormente se agregó metanol al 50% con cambios periódicos hasta lograr un fondo claro en el gel. Para la tinción con plata empleamos la técnica descrita por Wray y col. (1981). Una vez concluída la electroforesis los geles se dejaron en etanol al 50% durante varias horas para fijar las proteínas, luego se lavaron con un cambio de agua bidestilada y se dejaron nuevamente en metanol al 50% hasta observar una reducción en el tamaño del gel. La solución para teñir se preparó en dos partes; 0.8 g de  $\text{AgNO}_3$  se disuelven en 4 ml de agua bidestilada (Solución A) y por otro lado 21 ml de  $\text{NaOH}$  0.36% se mezclan con 1.3 ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (Solución B). La solución A se agregó gota a gota sobre la solución B con agitación constante y se aforó a 100 ml. El gel se sumergió inmediatamente en la solución durante 20 minutos en agitación sobre plataforma a 100 rpm. Se lavó el gel durante 5 minutos. En ese momento se preparó la solución reveladora con 2.5 ml de ácido cítrico al 1% y 0.25 ml de formaldehído 37%, se aforó con agua bidestilada a 500 ml. Se dejó en agitación con esta última solución hasta la aparición de las bandas, posteriormente la reacción se detuvo con ácido acético al 1%.



Esquema para analisis de las Subespecies de la RNA Polimerasa II en plantas de frijol.

Fig. 3

## RESULTADOS

## INMUNODETECCION DE LA ARN POLIMERASA II DE PLANTAS DE FRIJOL.

En un intento por detectar a la RNA polimerasa II de lisados totales de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) dada su importancia económica y facilidad para su manejo y cultivo (ver objetivos), utilizamos extractos crudos de tallo de la planta en 5 días de crecimiento, los cuales se incubaron por tiempos cortos (Ver fig. 5) y homogenizados a 4°C en presencia de 30 ml. de amortiguador "B" conteniendo inhibidores de proteasas y filtrado en gases estériles, para posteriormente ser sometidas a electroforesis en un gel de poli-acrilamida-SDS en gradiente lineal del 5-17.5%.

Para la detección de las subunidades mayores de la ARN polimerasa II de la planta utilizamos un anticuerpo policlonal dirigido contra las subunidades de mayor peso de la ARN polimerasa II purificada de timo de ternera.

La ARN polimerasa II responsable de la síntesis del ARN mensajero, ha sido aislada de algunos organismos y generalmente presenta cerca de 10 subunidades aproximadamente. Se ha estimado un peso molecular de 500 kd o un gradiente de sedimentación de 15s para ella. La estructura de la ARN polimerasa II purificada de timo de ternera, analizada mediante electroforesis en presencia de SDS (ver fig. 1). En esta se observan aproximadamente 10

subunidades; 3 de alto peso molecular (mayores de 100,000 d y el resto con pesos moleculares menores de 50,000 d.

En realidad los polipeptidos que se observan representan una mezcla de 3 subespecies de la enzima. Existen diversas evidencias que apoyan fuertemente la idea que la ARN polimerasa II de plantas y de mamíferos está formada por tres subespecies llamadas IIo, IIa y IIb las cuales tienen un peso molecular de 240 Kd, 214 Kd y 180 Kd respectivamente.

## ESPECIFICIDAD Y SENSIBILIDAD DE ANTICUERPOS CONTRA LA ARN POLIMERASA II, EN ENSAYOS CON LISADOS TOTALES DE FRIJOL Y CELULAS HELA

Se ha descrito que la ARN polimerasa II purificada de timo de ternera esta compuesta mayoritariamente por dos subespecies principales: IIa y IIb (Dahmus 1983). La mezcla de estas dos subespecies presenta tres polipeptidos de alto peso molecular; las subunidades que son únicas para cada subespecie (IIa-214,000 d y IIb 180,000 d respectivamente) y el polipeptido de 140,000 d que es común para todas las distintas subespecies. Además, en preparaciones altamente purificadas de la enzima, se observan 7 polipeptidos de menor peso molecular, que son comunes a las distintas especies de la enzima (ver fig.1); en general, se observan algunas bandas adicionales cuya concentración varía con las distintas preparaciones.

La subespecie IIo se encuentra en cantidades variables y cuando está presente, representa menos del 10% del total de las subespecies. Esta subespecie de la enzima presenta un polipeptido de 240,000 d. que es exclusivo de ella, además de los polipeptidos comunes a las distintas subespecies mencionadas anteriormente.

Los anticuerpos policlonales de conejo dirigidos contra la enzima purificada de timo de ternera, utilizados en el presente trabajo, reconocen en general fuertemente dos

polipéptidos de alto peso molecular: las subunidades IIA y IIB y la mayoría de las subunidades de bajo peso molecular. Estos anticuerpos exhiben sensibilidad diferencial hacia las distintas subespecies de la enzima; reconocen débilmente la subunidad IIB, reconocen fuertemente la subunidad IIA y aún más fuertemente la subunidad IIO.

Los 7 polipéptidos no son reconocidos por los anticuerpos con alta eficiencia como puede verse en las figuras 10 y 12.

Cuando analizamos la sensibilidad del anticuerpo contra las distintas subespecies de la enzima obtenida de un extracto crudo de lisados totales de frijol y células HeLa, encontramos que existe un polipéptido de 220,000 d y 240,000 d. respectivamente y deben representar las subunidades mayores de la ARN polimerasa II en estas células.

INMUNODETECCION DE LOS POLIPEPTIDOS DE MAYOR PESO  
MOLECULAR DE LA ARN POLIMERASA II DE PLANTAS DE FRIJOL  
Y CELULAS HELA.

Las plantas de frijol fueron crecidas durante 5 días, sobre vermiculita húmeda a 28°C como se especifica en métodos.

Nuestra primer interrogante era ver si el anticuerpo de conejo dirigido contra la enzima purificada de timo de ternera reconocía a la ARN polimerasa II de plantas de frijol y células Hela.

Para lograr esto obtuvimos extractos totales tanto de células Hela como de plantas de frijol, homogenizadas en 30 ml. de amortiguador "B" en presencia de PMSF (2mM inhibidor de proteasas) y a temperatura de 4°C (ver fig. 5).

Los ensayos para detectar los complejos inmunes, formados entre el anticuerpo de conejo y la subunidad reconocida, se realizaron utilizando proteína-A marcada radioactivamente con  $^{125}\text{I}$ . Para su visualización se utilizó, un cassette con pantalla intensificadora y una placa para rayos X. Posteriormente se dejó en un refrigerador a  $-70^\circ\text{C}$  exponiéndose durante el tiempo necesario.



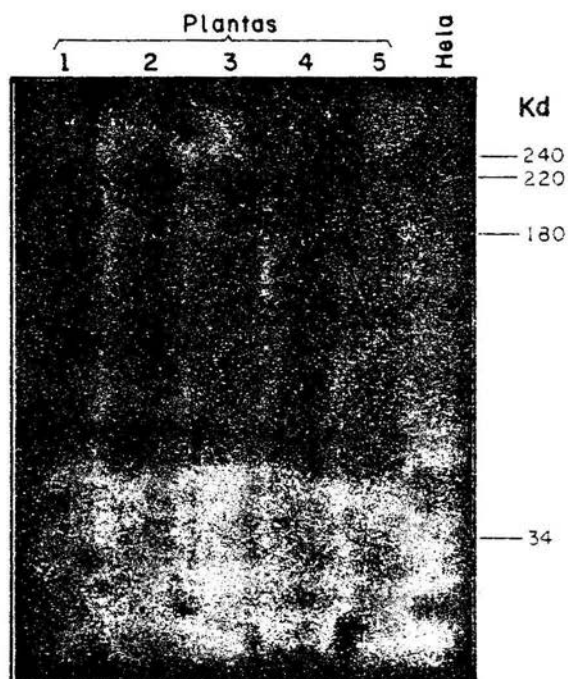


Fig. 5

Tiempos de Incubación a 4°C

1.- 0'

2.- 5'

3.- 10'

4.- 20'

5.- 30'

HeLa .- Extracto total de células HeLa

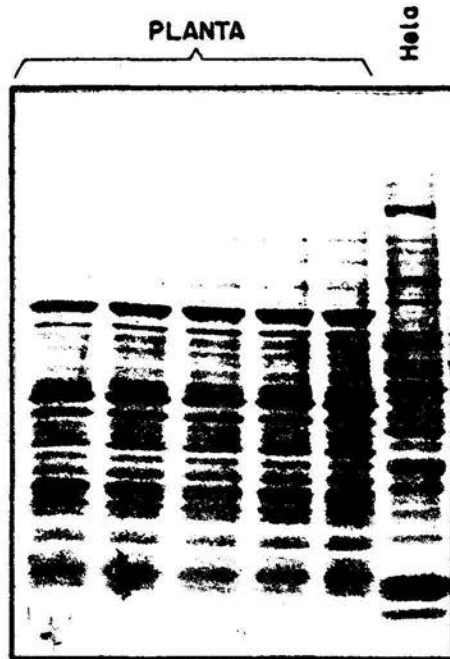


Fig. 6

Electroforésis de un gel de poliacrilamida - SDS en gradiente lineal del 5 al 17.5%

UNA SEGUNDA INTERROGANTE FUE VER SI EN REALIDAD 220,000 d. ERA EL PESO MOLECULAR DE LA SUBUNIDAD MAYOR DE LA ARN POLIMERASA II DE PLANTAS DE FRIJOL.

Para tal efecto utilizamos extractos crudos de tallo inflorescente de la planta de frijol (10 g aproximadamente) homogenizados en 30 ml de amortiguador "B" en presencia de PMSF 2mM y por otro lado extracto de tallo inflorescente (10 g aprox.) homogenizados en 30 ml de amortiguador, en ausencia del inhibidor de proteasas (PMSF) (ver fig. 7). Todo el procedimiento de extracción se efectua a temperatura de 4°C. Los extractos se filtraron en 6 capas de gasa estéril y alícuotadas para ser sometidas a gel de poliacrilamida-SDS en gradiente del 5-17.5%. Una vez terminado de correr o hasta que las muestras alcanzan el borde del gel que es de 16 horas a 60 volts. se transfirieron en una cámara de transferencia (Bio-Rad) durante 5 horas sobre un papel de nitrocelulosa (Ver métodos).

El papel se dejó bloqueando toda la noche y posteriormente se incubó con el primer anticuerpo dirigido contra la ARN polimerasa II y un segundo anticuerpo de chivo dirigido contra IgG de conejo acoplado a peroxidasa y revelado con reactivo de desarrollo de color (ver fig. 7).

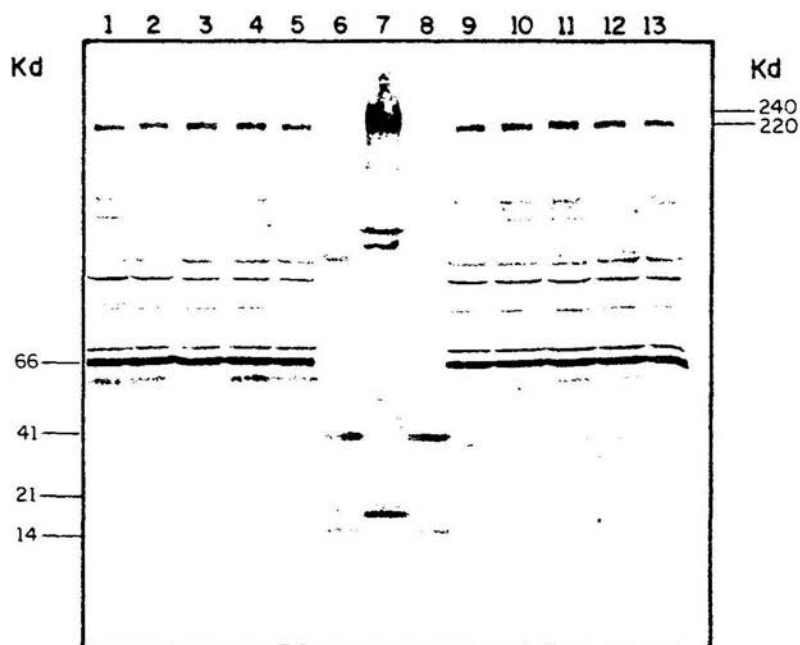


Fig. 7

Tiempos de incubación a 4°C	
Con inhibidor proteolítico	Sin inhibidor proteolítico
1.- 0'	9.- 0'
2.- 5'	10.- 5'
3.- 10'	11.- 10'
6.- 20'	12.- 20'
5.- 30'	13.- 30'

6,8.- Marcadores de peso molecular .  
7.- lisado total de células HeLa .

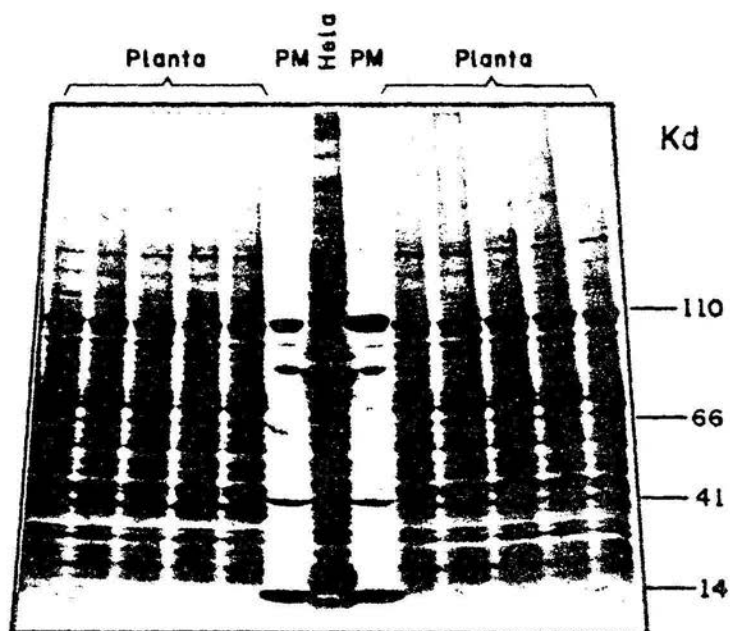


Fig. 8

Electroforésis en gel de poliacrilamida - SDS en gradiente lineal del 5 al 17.5% .

POSIBLE DEGRADACION PROTEOLITICA DE LA SUBUNIDAD MAYOR DE CELULAS HELA POR ACCION DE PROTEASAS DE UN EXTRACTO CRUDO DE FRIJOL.

Dado que no descartabamos la posibilidad que la planta tuviera proteasas fuertes, capaces de degradar a la subunidad mayor de 240,000 d para exhibir una de 220,000 d. nos propusimos mezclar las células Hela a las plantas antes de ser estas homogenizadas.

Fueron 2 cajas de petri con células Hela confluentes en monocapa (24/10-6). Se rasparon sobre diferentes concentraciones del homogenizado de plantas de frijol de 5 dias de crecimiento en 30 ml de amortiguador "B" sin inhibidores de proteasas e incubadas a 32°C por 30'.

Lo que observamos es que no existe un deterioro del péptido de mayor peso molecular de la ARN polimerasa II correspondiente a la planta del frijol y a las células Hela, ni aún agregando diferentes concentraciones de los extractos de la planta a las células Hela y favoreciendo la proteólisis específica con la temperatura se ve algún efecto.

Por otro lado se muestran controles de la planta y células Hela (ver fig. 9) carriles 5-8.

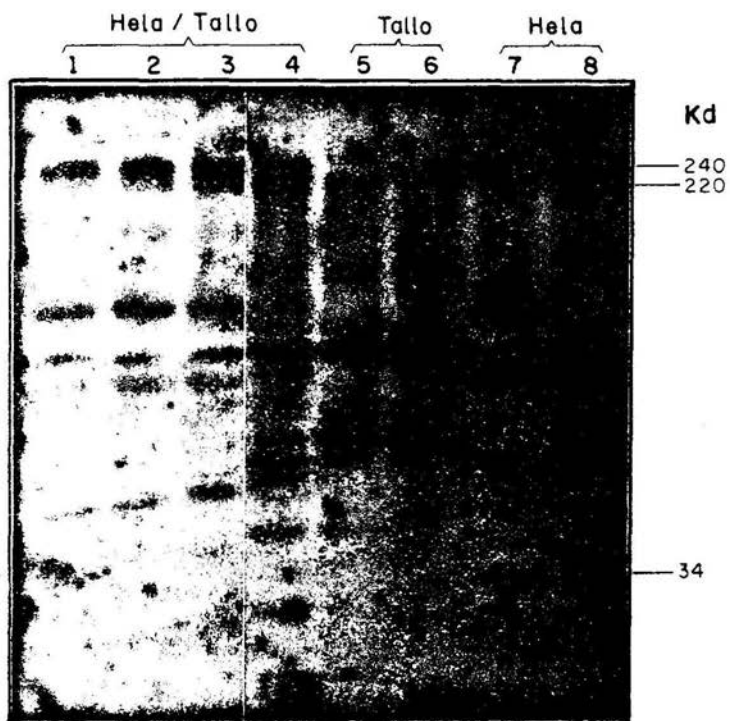


Fig. 9

Mezcla de extractos Hela - Planta incubados a 32°C/30'

- 1.- 2  $\mu$ l Planta + 50  $\mu$ l de cel Hela  
 2.- 10  $\mu$ l " "  
 3.- 20  $\mu$ l " "  
 4.- 50  $\mu$ l " "

5, 6.- Extracto de planta 0' de incubación  
 7, 8.- Extracto de Cel. Hela

EFFECTO DE INHIBIDORES DE PROTEASAS SOBRE LA ESTABILIDAD DE LA SUBUNIDAD IIO EN 3 HORAS DE INCUBACION A 4 C Y 32 C.

Vemos que extractos iniciales de plantas, contienen IIO únicamente, no obstante en enzimas purificadas de timo de ternera se visualizan las subespecies IIA y IIB principalmente en cantidades casi iguales. El hecho que las subunidades IIA y IIB estén ausentes a estos tiempos de incubación, es una fuerte evidencia que en verdad IIA y IIB sean producto de una proteólisis limitada de IIO durante los procesos de purificación de la enzima.

Sin embargo en 3 horas de incubación con diferentes amortiguadores conteniendo o no inhibidores de proteasas, no vemos una dramática reducción de IIO en las plantas del frijol (ver fig. 10).

En un intento por establecer las condiciones para trabajar "in vivo" la ARN polimerasa II podemos decir que aún en estos tiempos de incubación no existe una proteólisis parcial o una defosforilación de la subunidad mayor tanto de células HeLa como de la planta.



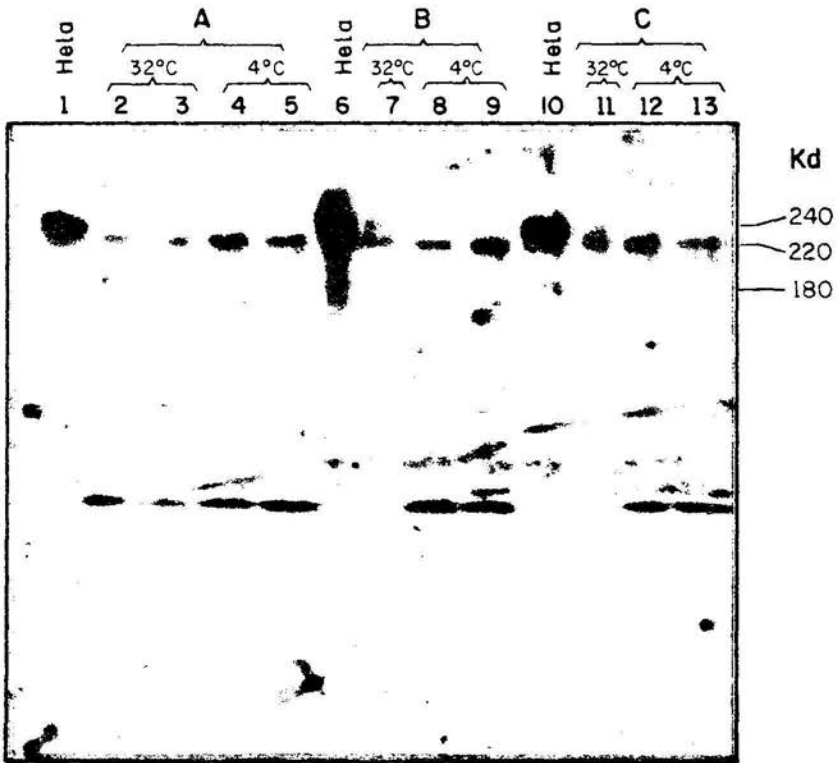


Fig. 10

3 hrs de incubación a 4°C y 32°C

A.- Amortiguador con PMSF, DTT, Leupeptina, N-etil maleimida

B.- Amortiguador PMSF, DTT

C.- Amortiguador

Células HeLa { 1  
 6  
 10

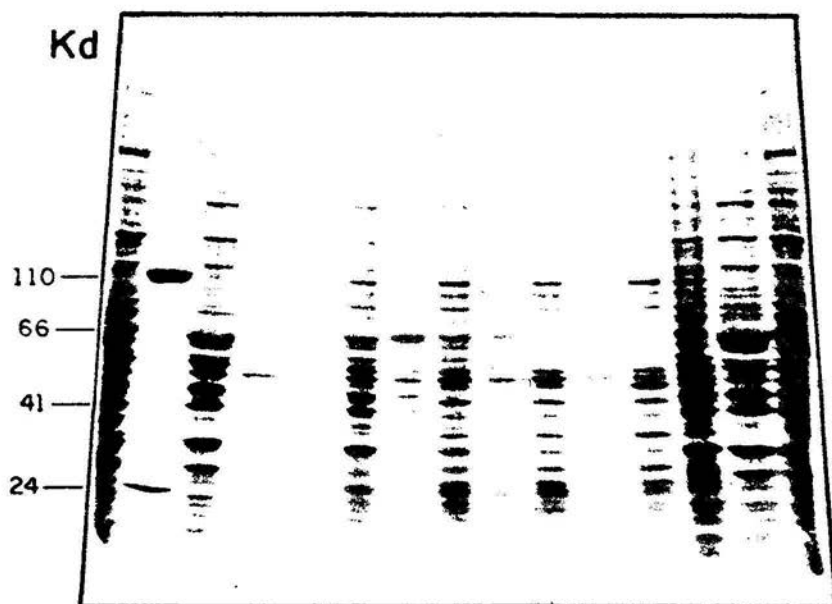


Fig. 11

Electroforesis en gel de poliacrilamida - SDS en gradiente linear del 5 al 17.5 % .

ANEJAMIENTO DE LA SUBUNIDAD IIO DE EXTRACTOS TOTALES DE PLANTAS Y CELULAS HELA.

Cuando incubamos los extractos de células Hela. y plantas de frijol en tiempos cortos de incubación no vemos un efecto dramático sobre la subunidad mayor de la ARN polimerasa II.

Resultados aquí presentados mediante el uso de anticuerpos específicos muestran que pueden usarse extractos crudos de plantas. En un intento por establecer la distribución de las subespecies de la ARN polimerasa II "in vivo", células Hela y plantas de frijol fueron lisados directamente en amortiguador "B" en presencia de inhibidores de proteasas e incubadas por tiempos más largos (ver fig. 12)

Así mismo podemos decir que se pueden trabajar extractos totales para estudiar la distribución y comportamiento de la ARN polimerasa II "in vivo". Vemos que a las 16 horas de añejamiento se siguen conservando los péptidos de mayor peso molecular de la planta mezclada con Hela aunque en menor proporción. (como puede observarse claramente en la fig. 12)

Aunque no detectamos un aumento en las subunidades I Ia y I Ib debido a la disminución de I Io excepto en extractos crudos de células Hela incubados a 32°C por 16 horas. Vemos aquí (carriles 13, 14 y 15) que si aumenta la cantidad de

I<sub>1a</sub> dada la disminución de I<sub>1o</sub>. Contrario a lo que observa Rangel y colaboradores, en un trabajo realizado en nuestro laboratorio ( Rangel y cols. 1986) donde muestra que a 4 horas post-infección del virus de polio en células HeLa, I<sub>1o</sub> disminuye no observando un incremento de I<sub>1a</sub> por la disminución de I<sub>1o</sub>.

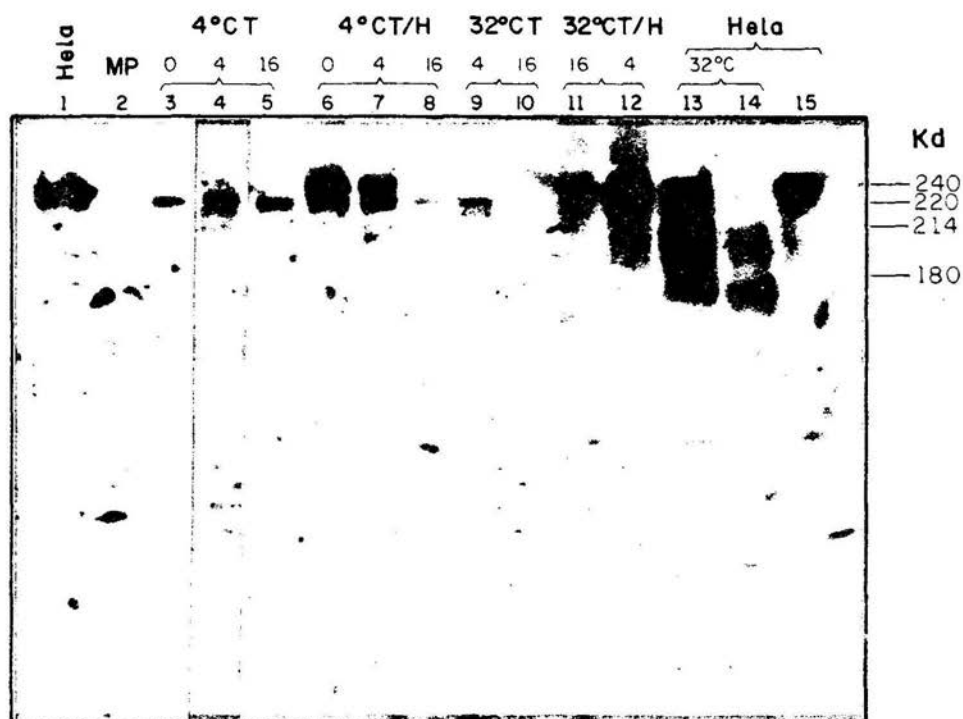


Fig. 12

- 1.- Lisado total de células HeLa
- 2.- Marcador de peso molecular
- 3.- 0' de incubación de un lisado de planta a 4°C
- 4.- 4' hrs " " "
- 5.- 16 hrs " " "
- 6.- 0' incubación de un ext. de planta mezclado con HeLa
- 7.- 4 hrs " " "
- 8.- 16 hrs " " "
- 9.- 4 hrs incubación 32°C de Planta
- 10.- 16 hrs " "
- 11.- 16 hrs " " de HeLa/planta
- 12.- 4 hrs " " "
- 13.- 4 hrs " " "
- 14.- 16 hrs " " "
- 15.- 0' incubación

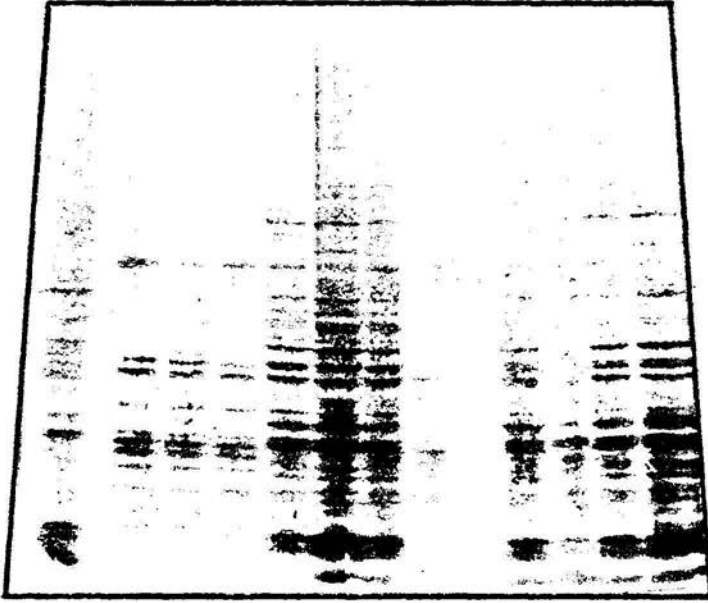


Fig. 13

Electroforésis en gel de poliacrilamida - SDS en gradiente del 5 al 17.5 % .

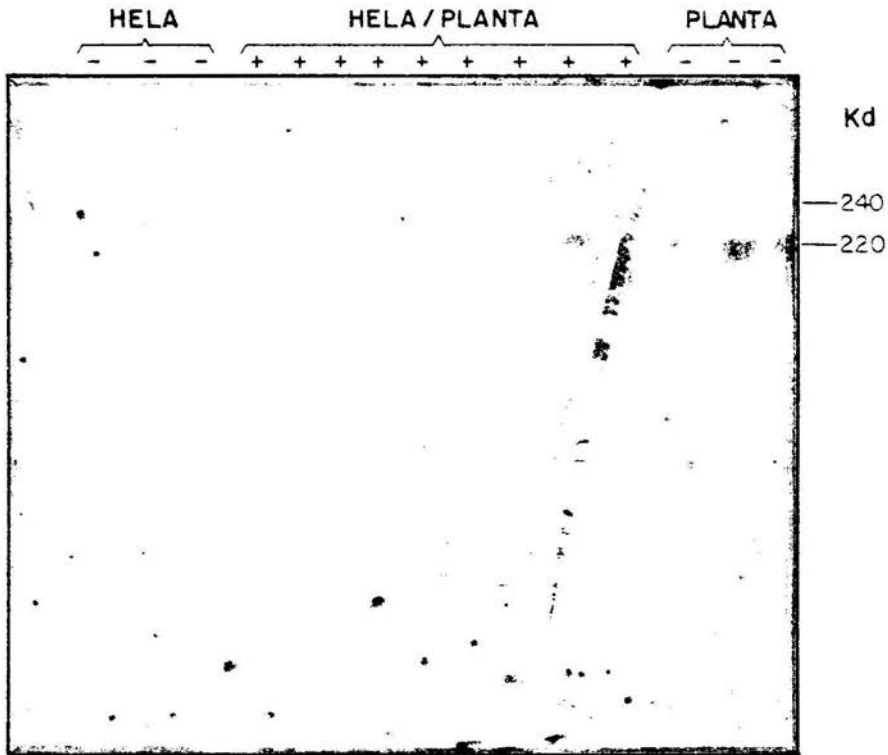


Fig. 14

1.-	50 $\mu$ l	extracto HeLa	$\text{NaVO}_3$	
2.-	30 $\mu$ l	"	"	"
3.-	20 $\mu$ l	"	"	"
4.-	50 $\mu$ l	extracto HeLa/Planta	con fosfatasa alcalina	5 unidades 5'
5.-	50 $\mu$ l	"	"	" 10'
6.-	50 $\mu$ l	"	"	" 15'
7.-	50 $\mu$ l	"	"	" 20'
8.-	50 $\mu$ l	"	"	" 25'
9.-	50 $\mu$ l	"	"	" 30'
10.-	50 $\mu$ l	"	"	" 35'
11.-	50 $\mu$ l	"	"	" 40'
12.-	50 $\mu$ l	"	"	" 45'
13.-	20 $\mu$ l	extracto planta	$\text{NaVO}_3$	
14.-	30 $\mu$ l	"	"	"
15.-	30 $\mu$ l	"	"	"

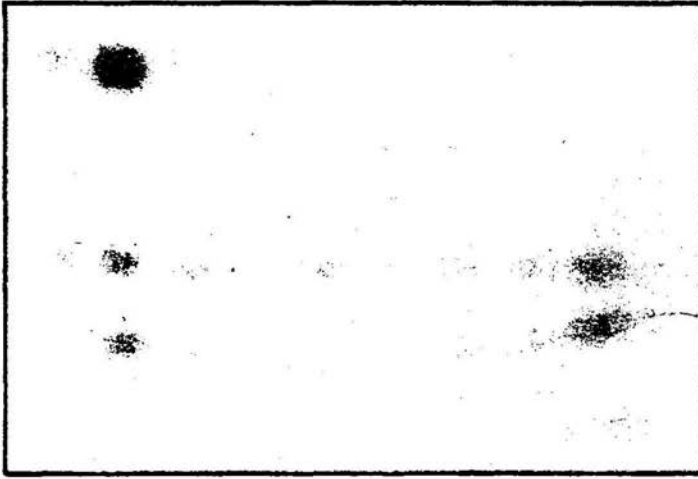


Fig. 15

Electroforesis en gel de Poliacrilamida - SDS al 5% .  
Ensayo con fosfatasa alcalina .



## DISCUSION

En el presente trabajo presentamos la detección de la ARN polimerasa IIo de la planta del frijol (*Phaseolus vulgaris*). Mediante el uso de anticuerpos policlonales dirigidos contra la ARN polimerasa II, examinamos la relativa concentración de las distintas subespecies en extractos totales de la planta.

Este peso molecular detectado en los extractos de la planta concuerda con lo reportado en extractos de perejil, soya y germen de trigo (36) (43).

Otros investigadores utilizando los métodos convencionales de purificación, como la sonicación observan solo las subunidades de menor peso molecular como lo es IIa y IIb. Creemos que el uso de anticuerpos dirigidos contra la enzima es un método directo para caracterizar la estructura de las poblaciones enzimáticas presentes en la célula. Utilizando esta última metodología, se encontró en nuestro laboratorio que la enzima unida a la cromatina está compuesta principalmente por la especie IIo. Esta subespecie está unida fuertemente a la cromatina y al parecer, es la subespecie que está activa en transcripción dado que no se desprende totalmente de la cromatina cuando está es tratada con altas concentraciones (1%) de Sarkosil, a diferencia de la subespecie IIa que se desprende totalmente mediante este tratamiento.

La ARN polimerasa purificada de los organismos eucariontes estudiados hasta la fecha, existe en 2 o 3 formas que difieren unicamente en el peso molecular de la subunidad mayor que presentan. Estas subespecies se denominan IIO, IIA y IIB (Ver fig. 1). En el presente trabajo nos preguntamos por la presencia de estas distintas subespecies en lisados totales, lo que encontramos es que sí existe reconocimiento del anticuerpo por la subunidad mayor de la ARN polimerasa II, aún siendo este dirigido contra la ARN polimerasa II de timo de ternera que pesa 240,000 d. Nosotros detectamos un peso molecular de 220,000 d (ver fig. 5)

En la mayoría de las preparaciones de enzimas purificadas a partir de diversos organismos, las subespecies IIA y IIB constituyen el mayor porcentaje. La subespecie IIO, cuando esta presente, se encuentra en pequeña proporción (no mayor del 10%).

Evidencias encontradas en nuestro laboratorio muestran que la proporción de IIO, en lisados totales y núcleos aislados de células CV-1, es elevada (mayor del 50%). Al purificar la población de enzima asociada a la cromatina, tanto en núcleos aislados de ratón como células CV-1, encontraron que la subespecie IIO es aún más elevada, representando como especie dominante, más de un 90%.

El análisis polipéptidico de las poblaciones de enzima libre y asociada, mostró que existen diferencias entre ellas (55); las observaciones previas que sugerían que estas dos poblaciones eran idénticas (53), no fueron confirmadas.

tal vez se deba a que la enzima sufre un procesamiento proteolítico asociado al proceso de transcripción.

Cuando analizamos el peso molecular de la subunidad mayor en lisados totales con y sin inhibidores de proteasas, vemos que no existe ninguna diferencia ni efecto sobre el péptido de mayor peso molecular de la planta (fig. 7)

Se ha sugerido que las subunidades mayores de las subespecies IIa y IIb se originan por proteólisis específica "in vitro" del componente de mayor peso molecular (IIo). Es decir, que la única subespecie codificada genéticamente sea IIo (40).

Una segunda alternativa resulta el suponer que las distintas subespecies sean codificadas por diferentes genes, aunque relacionadas entre sí. Finalmente existe la posibilidad de una situación intermedia de que IIa y IIb existen en la célula y se originan por procesamiento proteolítico de IIo "in vivo". Esta hipótesis abre la posibilidad de que IIa y IIb jueguen un papel en el proceso de transcripción (41).

Se ha mostrado tanto en levadura (41), *Drosophila* (42) y germen de trigo (43) la existencia de actividades proteolíticas capaces de convertir "in vitro" la subunidad IIa en IIb.

A esto respecto nosotros pensamos que tal vez el péptido de 220,000 d en realidad pesaba 240,000 d como sucede en mamíferos, y que debido a un procesamiento proteolítico durante la lisis se procesaba de tal manera que a la subespecie de mayor peso le

confería un mayor corrimiento electroforético. Todo esto debido quizás a una proteólisis limitada de IIo propia de la planta.

Lo que hicimos a este respecto fué mezclar planta y células HeLa en ausencia de inhibidores de proteasas e incubadas a 32 °C por un tiempo de 30 minutos, lisandolas juntas para ver el efecto de la planta sobre las células HeLa. Observamos que ambos polipéptidos mantenían su estructura molecular (fig. 5)

Estudios realizados con germinado de soya, trigo y embriones de erizo de mar han mostrado la conversión de la subespecie IIa a la forma IIb, asociada a la germinación y en unos casos al embriogénesis.

Respecto al origen de dicho procesamiento proteolítico se plantean dos posibilidades:

- 1) Proteólisis artificial, asociada a los procedimientos comunes empleados en las purificaciones.
- 2) Proteólisis normal de la enzima "in vivo".

Respecto del primer punto cabé mencionar lo siguiente:

Encontramos que durante un añejamiento de un extracto mezclando células HeLa con planta, y la planta unicamente, no presentar incremento en la forma IIa dado la disminución de la subunidad IIo (ver fig. 10).

Extractos de planta de perejil a pH 9.0 presenta mayor contenido de las formas IIa y IIo; es decir soluciones alcalinas podían prevenir o retardar la proteólisis de IIo y IIa (31)

Tocando el segundo punto se puede mencionar lo siguiente :  
El procesamiento de la enzima ocurre en la célula, en que momento ocurre? acaso es una autocatalisis? esta implicado el procesamiento en el fenomeno de trascripción?

No obstante, la reducción puede deberse a una defosforilación de la subunidad IIO dando como resultado la formación de la subunidad IIA, o por una proteólisis limitada resultando la subunidad IIB. Aún en estos tiempos de incubación nosotros no logramos distinguir entre estas posibilidades.

Además el anticuerpo utilizado en estos experimentos reacciona principalmente con el péptido que se repite 52 veces y está en el extremo C-terminal de la subunidad IIO y IIA y a consecuencia de ello reacciona débilmente con la subunidad IIB (Kim y Dahmus enviado a publicación).

Así mismo vemos que nuestros resultados difieren de los obtenidos por otros investigadores, en el sentido que a más tiempo de incubación (de 3 horas en adelante) y sin inhibidores no vemos una dramática reducción de IIO (fig 12).

Respecto a la hipótesis planteada de que la enzima es defosforilada, hicimos algunos ensayos con fosfatasa alcalina para ver algún posible efecto de esta sobre la subunidad mayor de la ARN polimerasa II. Lo que vimos fué que no actuó la fosfatasa sobre el sustrato, dejando intacto el polipéptido de mayor peso molecular. Hasta el momento no hemos esclarecido este fenomeno.

Por otro lado, hicimos algunos ensayos con anticuerpos dirigidos contra la ARN polimerasa II, purificada de timo de ternera, para rastrear el gene que codifica para la ARN polimerasa II de la Planta del frijol, utilizando una biblioteca genómica de frijol, generosamente prestada por el Dr. Luis Herrera Estrella. Por el momento tenemos algunas clonas seleccionadas, que servirán para la clonación del gene, lo cual sería de gran utilidad en el entendimiento de muchas cosas que aún están obscuras en el proceso denominado transcripción.

Futuros experimentos están enfocados a la utilización de la fosfatasa tanto en núcleos aislados como en lisados totales.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Kornberg, R. D., Thomas, J. O. (1974) "Chromatin Structure: A repeating unit of histones and DNA". *Science* 184:868-871.
- 2) Oudet, P., Gross-Bellard, M., Chambon, P. (1975) "Electron microscopy and biochemical evidence that Chromatin structure is a repeating unit. *Cell* 4:261-300.
- 3) Noll, M. (1974) "Internal structure of the chromatin subunit. *Nucl Acids Res* 1:1573-1578.
- 4) Shaw, E. R., Herman, T. M., Kovacic, R. T., Beaudreau, Van Holde, K. E. (1976) "Analysis of subunit organization in chicken erythrocyte chromatin" *Proc Natl Acad Sci USA* 73:505-509.
- 5) Pardon, J. F., Worcester, D. L., Woolley, J. O., Tatchell, K., Van Holde, K. E., Richards, B. M. (1975) "Low angle neutron scattering from chromatin subunit particles". *Nucl Acids Res* 2:2163-2182.
- 6) Hjelm, R. P., Kneale, G. S., Suau, P., Baldwin, J. P., Bradbury, E. M., Ibb, K. (1977) "Small angle neutron scattering studies of chromatin subunits in solution" *Cell* 10:139-151.
- 7) Paulson, J. S., Laemmli, U. K. (1977) "The structure of histone-depleted metaphase chromosomes" *Cell* 12:817-820.

- 8) Benyajati, C., Worcel, A. (1976) "Isolation, characterization, and structure of the folded interphase genome of *Drosophila Melanogaster*" *Cell* 9:393-407.
- 9) Vogelstein, B., Pardoll, D. M., Coffey, D. S. (1980) "Supercoiled loops and eukariotic DNA replication" *Cell* 22:79-85.
- 10) Peterson, J. L. McDonkey, E. H. (1976) "Nonhistone chromosomal proteins from HeLa cells. A survey by high resolution, two dimensional electrophoresis" *J Biol Chem* 251:548-554.
- 11) Pederson, T. (1977) "Isolation and characterization of chromatin from the cellular slime mold, *Dictyostelium discoideum*" *Biochemistry* 16:2771-2777.
- 12) Fukui, Y. (1979) "Intranuclear actin bundles induced by dimethyl sulfoxide in interphase nucleus of *Dictyostelium*" *J Cell Biol* 76:146-157.
- 13) Goodwin, G. H., Sanders, C. Johns, E. W. (1978) "A new group of chromatin associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids" *Eur J Biochem* 33:14-19.
- 14) Isackson, P. J., Reock, C. (1981) "Nonhistone chromatin proteins HMG-14 and HMG-17 bind preferentially to single-stranded DNA" *Nucl Acids Res* 9:3779-3791.



- 15) Mathew, D. G. P., Goodwin, G. H., Johns, E. W. (1979) "Studies on the association of the high mobility group non-histone chromatin proteins with isolated nucleosomes" *Nucl Acids Res* 6:167-179.
- 16) Chambon, P. (1977) "Summary: The molecular biology of the eucaryotic genome is coming of age" *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* XLII, 1209-1234.
- 17) Lewin, B. (1980) "Gene expression" Vol 2, 2nd Ed., Eucaryotic chromosomes John Wiley & Sons.
- 18) Maintraub, H., Groudine, M. (1976) "Chromosomal subunits in active genes have an altered conformation" *Science* 193:848-856.
- 19) Colletier, R. D., Mulvihill, E. R., McKnight, G. S., Sussar, A. W. (1973) "Regulation of gene expression in the chick oviduct by steroid hormones" *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 42:639-657.
- 20) Davie, J. T., Candido, P. M. (1978) "Acetylated histone H4 is preferentially associated with template-active chromatin" *Proc Natl Acad Sci USA* 75:3574-3577.
- 21) Weill, S. D. (1960) "Enzymatic incorporation of ribonucleoside triphosphates into the interpolynucleotide linkages of ribonucleic acid" *Proc Acad Sci USA* 46:1020-1030.
- 22) Lewis, M. K., Burgess, R. R. (1982) "Eukaryotic RNA polymerases" in the enzymes (Boyer, P. D. ed) Vol XV, pp. 109-153, Academic Press, New York.

- 23) Widnell, C. C., Tata, J. R. (1964) "Evidence for two DNA- dependent RNA polymerase activities in isolated rat- liver nuclei" *Biochim Biophys Acta* 87:531-533.
- 24) Widnell, C. C., Tata, J. R. (1966) "Studies on the stimulation by ammonium sulphate of the DNA-dependent RNA polymerase of isolated rat-liver nuclei" *Biochim Biophys Acta* 123:478-492.
- 25) Stirpe, F., Fiume, L. (1967) "Studies on the pathogenesis of liver necrosis by alpha-amanitin. Effect of alpha- amanitin on ribonucleic acid synthesis and on ribonucleic acid polymerase in mouse liver nuclei. *Biochem J* 105:779-782.
- 26) Roeder, R. G., Rutter, W. J. (1969) "Multiple forms of DNA-dependent RNA polymerase in eukaryotic organisms" *Nature (Lond)* 224:234-237.
- 27) Kedinger, C., Nuret, P., Chambon, P. (1971) "Structural evidence for two alpha-amanitin sensitive RNA polymerases in calf thymus" *FEBS Lett* 15:169-174.
- 28) Dezelee, S., Senetenac, A. (1973) "Role of DNA-RNA hybrids in eukaryotes. Purification and properties of yeast RNA polymerase P" *Eur J Biochem* 34:41-52.
- 29) D'Alessio, J. M., Perna, F. J., Paule, M. R. (1979) "DNA- dependent RNA polymerase from *Acanthamoeba castellanii*" *J Biol Chem* 254:11282-11287.
- 30) Dahnus, M. E. (1981) "Phosphorylation of eukaryotic DNA- dependent RNA polymerase" *J Biol Chem* 256:3332-3339.

- 31) Guilfoyle, T. J., Hagen, G., Malcolm, S. (1984a)  
"Immunological studies on plant DNA-dependent RNA  
polymerases with antibodies raised against individual  
subunits" *J Biol Chem* 259:640-648.
- 32) Jendrisak, J., Skuzeski, J. (1983) "Subunit structure  
differences in RNA polymerase II purified from  
ungerminated versus germinated wheat embryos" *Plant  
Physiol* 72:1068-1074.
- 33) Schwartz, L. B., Roeder, R. G. (1975) "Purification  
and subunit structure of deoxyribonucleic  
acid-dependent ribonucleic acid polymerase II from the  
mouse plasmacytoma, MOPC 315" *J Biol Chem*  
250:3221-3228.
- 34) Mandel, J. L., Chambon, P. (1971) "Purification of  
RNA polymerase B activity from rat liver" *FEBS Lett*  
15:175-180.
- 35) Keding, C., Gissinger, F., Chambon, P. (1974)  
"Animal DNA-dependent RNA polymerases. Molecular  
structures and immunological properties of calf-thymus  
enzyme AI and of Calf thymus and rat-liver enzymes B"  
*Eur J Biochem* 44:421-436.
- 36) Jendrisak, J. J., Burgess, R. R. (1975) "A new method  
for the large-scale purification of wheat germ DNA-  
dependent RNA polymerase II" *Biochemistry*  
14:4672-4675.

- 37) Link, G., Kidd, G. H., Richter, G., Bogorad, L. (1978)  
"Structural relationships among the multiple forms of  
DNA-dependent RNA polymerase II from cultured parsley  
cells" *Eur J Biochem* 91:363-368.
- 38) Kedingler, C., Chambon, P. (1972) "Animal  
DNA-dependent RNA polymerases 3. Purification of  
calf-thymus B1 and B11 enzymes" *Eur J Biochem*  
28:283-290.
- 39) Dahms, M. E., Kedingler, C. (1983) "Transcription of  
adenovirus-2 major late promoter is inhibited by  
monoclonal antibody directed against RNA polymerases  
II $\alpha$  and II $\beta$ " *J Biol Chem* 258:2303-2307.
- 40) Weeber, R. F., Blatti, S. P., Rutter, W. J. (1971)  
"Molecular structure of DNA-dependent RNA polymerases  
(II) from calf thymus and rat liver" *Proc Natl Acad  
Sci USA* 68:2994-2999.
- 41) Dezelse S., Myers, F., Sentenac, A., Fromageot, P.  
(1976) "Two forms of RNA polymerase B in yeast.  
Proteolytic conversion in vitro of enzyme B1 into B11"  
*Eur J Biochem* 65:543-552.
- 42) Greenleaf, A. L., Haars, R., Bautz, E. K. F. (1976)  
"In vitro proteolysis of a large subunit of *Drosophila  
melanogaster* RNA polymerase B" *FEBS Let* 71:205-208.

- 43) Guilfoyle, T. J., Jendrisak, J. J. (1978) "Plant DNA-dependent RNA polymerases: Subunit structures and enzymatic properties of the class II enzymes from quiescent and proliferating tissues" *Biochemistry* 17:1860-1866.
- 44) Guilfoyle, T. J., Hagen, G., Malcolm, S. (1984b) "Size heterogeneity of the largest subunit of nuclear RNA polymerase II. An immunological analysis" *J Biol Chem* 259:640-648.
- 45) Christman, J. L., Dahmus, M. E. (1981) "Monoclonal antibody specific for calf thymus RNA polymerase IIO and IIA" *J Biol Chem* 256:11798-11803.
- 46) Weeks, J. R., Douglas, E. C., Greenleaf, A. (1982) "Immunological studies of RNA polymerase II using antibodies to subunits of *Drosophila* and wheat germ enzyme" *J Biol Chem* 257:5884-5891.
- 47) Kramer, A., Haars, R., Kadisch, R., Will, H., Bautz, F., Bautz, E. K. F. (1980) "Monoclonal antibody directed against RNA polymerase II of *Drosophila melanogaster*" *Mol Gen Genet* 180:193-197.
- 48) Link, G., Kidd, G. H., Richter, G., Bogorad, L. (1978) "Structural relationships among the multiple forms of DNA-dependent RNA polymerase II from cultured parsley cells" *Eur J Biochem* 71:363-368.
- 49) Carroll, G. B., Stollar, B. E. (1983) "Conservation of a DNA-binding site in the largest subunit of eukaryotic RNA polymerase II" *J Mol Biol* 170:777-790.

- 50) Horikoshi, M., Tamura, H., Sekimizu, K., Obinata, M., Natori, S. (1983) "Identification of the DNA binding subunit of RNA polymerase II from Ehrlich Ascites tumor cells" *J Biochem* 94:1761-1767.
- 51) Gariglio, P., Buss, J., Green, M. H. (1974) "Sarkosyl activation of RNA polymerase activity in mitotic mouse cells" *FEBS Lett* 44:330-333.
- 52) Green, M. H., Buss, J., Gariglio, P. (1975) "Activation of nuclear RNA polymerase by sarkosyl" *Eur J Biochem* 53:217-225.
- 53) Yu, F. L. (1975) "An improved method for the quantitative isolation of rat liver nuclear RNA polymerases" . *Biochim Biophys Acta* 395:329-336.
- 54) Rangel, L. M., Fernandez-Tomas, C., Dahmus, M. E., Gariglio, P. (1986) "Modification of RNA polymerase IIO subspecies after poliovirus infection" *J Virol*
- 55) Garcia, A., Miguel, F., Dahmus, M. E., Gariglio, P. (1986) "Structure of monkey kidney cell RNA polymerase associated with SV40 DNA transcriptional complexes" *Arch Biochem Biophys* 25:232-238.