

210  
2 ef



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**LA REVERSO TRANSCRIPTASA DEL VIH-1**

CARACTERIZACION DE SU ACTIVIDAD DE REPLICASA

E

IMPLICACIONES EN LA EVOLUCION DE GENOMAS CELULARES

**TESIS CON  
FALTA DE ORIGEN**

**T E S I S**

Que para obtener el título de:

**BIOLOGA**

**P R E S E N T A :**

**Bertha Verónica Valverde Garduño**



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## INDICE

<b>RESUMEN</b>	1
<b>INTRODUCCION</b>	2
<b>ORIGEN DE LA INFORMACION GENETICA EN LAS PRIMERAS CELULAS</b>	4
<b>EVOLUCION DE LOS MECANISMOS REPLICATIVOS EN SISTEMAS AUTOPOYETICOS</b>	5
<b>ORIGEN DE LA TRANSCRIPCION INVERSA</b>	7
<b>LA REVERSO TRANSCRIPTASA</b>	8
Dominios funcionales y evolución molecular	9
El origen Arqueano de la Reverso Transcriptasa	11
<b>CACIONES METALICOS Y POLIMERASAS</b>	12
<b>LA TEVERSO TRANSCRIPTASA DEL VIH-1</b>	13
<b>UN MODELO DE REPLICASA ANCESTRAL</b>	14
<b>MATERIALES Y METODOS</b>	15
Bacterias y plásmidos	15
Reactivos	17
Soluciones	17
Extacción de plásmido	18
Pureza y cuantificación de DNA	19
Corte de DNA con enzimas de restricción	19
Columna de DEAE-Sephacell (de intercambio iónico)	19
Electroforesis en gel de agarosa	19
Preparación de bolsas de diálisis y dializado	20
Purificación parcial de la RT del VIH-1	20
Electroforesis en gel de poliacrilamida	22
Tinción de geles de poliacrilamida	22
Ensayos de actividad enzimática de las RTs	23
<b>RESULTADOS</b>	24
<b>I REVERSO TRANSCRIPTASA DEL VIH-1</b>	24
Extracción del plásmido	24
Purificación parcial de la RT del VIH-1	24
Condiciones óptimas de actividad de la RT	28
Caracterización de su actividad de replicasa	32

II REVERSO TRANSCRIPTASA DEL AMV	34
Caracterización de su actividad de replicasa	34
<b>DISCUSION</b>	39
LA ACTIVIDAD DE REVERSO TRANSCRIPTASA	39
EL MANGANESO Y LA INDUCCION DE ACTIVIDAD DE REPLICASA	39
LA ACTIVIDAD DE REPLICASA Y EL ORIGEN DE LAS RTs	41
LA ACTIVIDAD DE REPLICASA Y LA TRANSICION RNA-DNA	42
ACTIVIDAD DE REPLICASA Y GENOMAS VIRALES	44
IMPLICACIONES DE LA INHIBICION DE LA ACTIVIDAD DE RT EN PRESENCIA DE MANGANESO	45
EFECTO DEL MAGNESIO SOBRE LA ACTIVIDAD DE REPLICASA	46
DIVERSIDAD DE SUBSTRATOS Y ESPECIFICIDAD	47
AMBIGÜEDADES DE SUBSTRATO Y MOLDE DE DIVERSAS POLIMERASAS	47
<b>CONCLUSIONES</b>	48
<b>PERSPECTIVAS</b>	49
<b>REFERENCIAS</b>	50
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	57

## RESUMEN

El problema del huevo y la gallina respecto al origen del DNA y las proteínas en las células actuales quedó resuelto cuando la idea de que el RNA antecedió al DNA como material genético y a las proteínas como catalizadores biológicos, quedó apoyada por múltiples evidencias experimentales. Una consecuencia inmediata de ésta hipótesis es que durante la transición de RNA a DNA debió surgir a partir de las replicasas ancestrales una proteína capaz de polimerizar desoxirribonucleótidos utilizando un molde de RNA, es decir, una DNA polimerasa RNA dependiente o reverso transcriptasa (RT) que contribuyó, en las células ancestrales de RNA y proteínas, al episodio final en la evolución del tipo de moléculas informativas que se conservaría hasta las células actuales; ésta enzima fué crucial en el establecimiento del DNA como material genético en todas las células. Si esto ocurrió así entonces es posible considerar como punto de origen de las RT's esta etapa de la evolución biológica y recuperar en ellas una actividad vestigial de replicasa ya que serían enzimas evolutivamente cercanas a las replicasas ancestrales.

Las RT's son enzimas dependientes de  $Mg^{++}$  para su actividad de DNA polimerasas; asimismo requieren un polinucleótido como molde, un oligonucleótido complementario al extremo 3' del molde como cebador y los nucleótidos complementarios. Se ha encontrado que algunas presentan actividad en presencia de  $Mn^{++}$  aunque es muy baja; con respecto a la normal, excepto para la RT del virus de leucemia de murinos, donde la actividad aumenta considerablemente.

Se sabe que el  $Mn^{++}$  es capaz de inducir en diversas nucleótido polimerasas una pérdida de especificidad en cuanto a su sustrato o bien en cuanto al tipo de polinucleótido que utilizan como molde natural. En este trabajo se determinaron inicialmente las condiciones óptimas para la actividad de la RT del VIH-1 parcialmente purificada (pH 8.0,  $MgCl_2$  5mM, NaCl 2mM y ausencia de KCl). Se reporta la inducción de actividad de replicasa (i.e., RNA polimerasa RNA dependiente) en las mismas condiciones excepto que el  $MgCl_2$  se sustituyó por  $MnCl_2$  a una concentración óptima de 5mM. En este caso la actividad enzimática es aproximadamente el 45% de su actividad natural. En condiciones similares la RT del Virus de Mieloma de Aves (AMV-RT) presentó actividad de replicasa correspondiente al 30% de su actividad natural; su actividad de reverso transcriptasa se inhibió en presencia de  $Mn^{++}$ . Estos descubrimientos podrían tener aplicación terapéutica en enfermos de SIDA.

Inesperadamente se encontró que la actividad de replicasa ocurre también en presencia del cofactor natural  $Mg^{++}$ , para ambas enzimas, aunque en un porcentaje extremadamente bajo, de solo 10%.

Se analiza la interacción de cofactores con las enzimas y su efecto sobre la especificidad de las mismas. Finalmente se discuten las implicaciones que estos hallazgos tienen en el estudio de diversas etapas en la evolución de genomas celulares y de otras entidades genéticas, particularmente en la fase de transición de RNA hacia DNA y en etapas previas de la evolución celular, donde ciertos catalizadores inorgánicos, que ahora son sólo cofactores, pudieron haber tenido importancia crucial en diversos procesos celulares.

## INTRODUCCION

Si bien resulta difícil definir qué son los seres vivos, es posible encontrar un conjunto de características comunes a todos ellos, entre las que se cuentan la presencia de una barrera que los delimite manteniendo su individualidad y distinguiéndolos del medio, su capacidad de automantenerse tomando y transformando materia y energía del medio, así como su capacidad de autorreproducirse; estas características han sido consideradas para definirlos como sistemas autopoyéticos (Varcla y Maturana, 1973), definición dentro de la cual sólo caben sistemas formados por células. Posiblemente debería considerarse también su capacidad de participar y ser sujetos de selección natural, definida como reproducción (autorreproducción) diferencial, es decir, su característica de ser sujetos de la evolución biológica. Pero las dos últimas características, autorreproducción y evolución, son fundamentales y dependen principalmente de la capacidad de éstos sistemas para almacenar, utilizar y transformar información. La molécula donde se almacena información en todas las células actuales es el DNA; la distribución universal de ésta molécula y de los mecanismos del flujo de información entre las células actuales llevó al planteamiento del bien conocido "Dogma Central de la Biología Molecular" (Crick, 1958), en el que se establece que la información se replica para su transmisión a la progenie de DNA a DNA, y dentro de la célula se expresa fluyendo del DNA hacia el RNA y después a las proteínas (Figura 1).

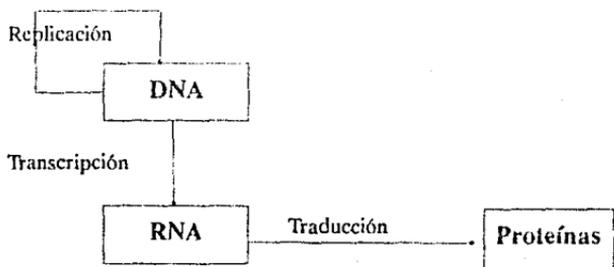


Figura1. DOGMA CENTRAL DE LA BIOLOGIA MOLECULAR (1958). Esquema del flujo de la información genética y procesos involucrados, en las células actuales, de acuerdo con lo establecido por Crick (1958) en el mal llamado " Dogma Central de la Biología Molecular ".

Sin embargo, el dogma no quedó intacto por mucho tiempo, pues poco después se encontró que la información puede fluir del RNA hacia el DNA (contraviniendo, al menos en parte, dicho "dogma"), ya que algunos virus de RNA (los retrovirus, en particular) requieren una fase intermedia de DNA en su ciclo infectivo. Este proceso de transcripción de DNA a RNA (reverso transcripción) es llevado a cabo por una DNA polimerasa RNA dependiente o reverso transcriptasa (RT) (Temin y Mizutani, 1970; Baltimore, 1970) y su descubrimiento

provocó la modificación del esquema del flujo de información genética en células actuales por el propio Crick (1970) como aparece en la Figura 2.

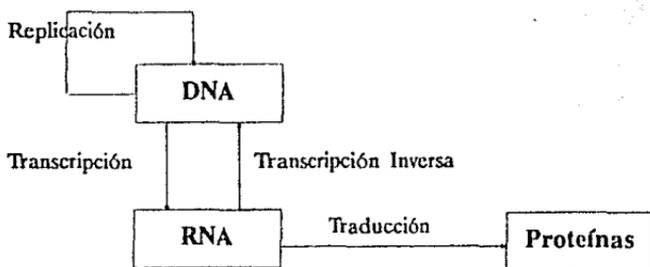


Figura 2. DOGMA CENTRAL DE LA BIOLOGIA MOLECULAR (1970). Modificación del esquema del flujo de la información genética propuesto por Crick (1970) después del descubrimiento de la transcripción inversa en algunos virus (Temin y Mizutani, 1970; Baltimore, 1970 ).

El diagrama modificado del flujo de información genética es una representación extremadamente simplificada, pues cada uno de los procesos requiere un gran número de moléculas para llevarse a cabo aún en la célula más sencilla. Así, en la replicación del DNA intervienen varias DNA polimerasas, topoisomerasas, helicasas, ligasas, y una primasa, además de otras enzimas específicas (Kornberg, 1984; 1988); en la transcripción es necesaria la actividad de RNA polimerasas DNA dependientes y de un conjunto de factores que controlan el inicio y término de la misma; finalmente, la traducción es un proceso tan complejo que si consideramos solamente al ribosoma encontramos que está formado por más de 50 proteínas y varias moléculas de RNA. La complejidad de éste aparato encargado de la transmisión de la información de una célula a sus descendientes y de la expresión y utilización de la misma en su interior no pudo haber surgido directamente de la sopa primitiva al ocurrir una conjunción afortunada de monómeros para formar polímeros y de éstos para constituir una célula.

De hecho, la mayoría de los modelos precelulares propuestos y construidos en el laboratorio como los coacervados (Oparin, 1936), sulfobios (Herrera, 1942) y microsferulas proteicas (Fox y Dose 1977) carecen de una molécula capaz de guardar y transmitir información genética susceptible de cambio.

Así pues, todo el complicado aparato informacional de las células contemporáneas debió ser mucho más sencillo inicialmente, ya que su estado actual solo puede ser entendido como producto de la evolución biológica a partir de sistemas autopoyéticos mucho menos complejos que los seres vivos de hoy en día.

Varios hallazgos recientes de la biología molecular y de la bioquímica permitieron la aceptación de una hipótesis sobre el origen del material genético, y el desarrollo de un esquema sobre la evolución del flujo de información genética en sistemas autopoyéticos que explica el origen y la complejidad del sistema actual.

## ORIGEN DE LA INFORMACION GENETICA EN LAS PRIMERAS CELULAS

El problema del origen de la información genética no se refiere solamente al origen de la molécula en la que reside, sino también a los mecanismos necesarios para su transmisión y expresión. Hoy en día la replicación de DNA depende estrictamente de un conjunto de catalizadores extraordinariamente específicos que son las proteínas; éstas a su vez dependen del DNA, pues la información para su estructura y síntesis se encuentra en dicha molécula. Esta interdependencia extrema llevó a pensar que la aparición de una no pudo haber antecedido a la otra, y se entró entonces al problemático círculo que la metáfora del huevo y la gallina describe acertadamente. Sin embargo, hay una tercera posibilidad: pudo haber existido una molécula con ambas características, es decir con capacidad de guardar información genética y de catalizar las reacciones necesarias para su replicación. El RNA es el mejor candidato con estas propiedades que se ha encontrado hasta la fecha (Alberts, 1986; Gilbert, 1986; Lazcano, 1986).

Ciertamente la hipótesis de que el RNA antecedió al DNA se había propuesto en varias ocasiones anteriores (Oparin, 1961; Haldane, 1965; Crick, 1968; Orgel, 1968; Eigen *et al.*, 1981) con base en la posibilidad de sintetizar proteínas en ausencia de DNA pero no de RNA, y en la capacidad del RNA para guardar información genética como ocurre con múltiples virus y viroides. Sin embargo, esta idea cobró fuerza cuando se encontraron varios ejemplos de actividad catalítica en moléculas de RNA, lo que permitió replantearla (Pace y Marsh, 1985; Alberts, 1986; Gilbert, 1986; Lazcano, 1986; Nisbet, 1986; Darnell y Doolittle, 1986; Holland y Blake, 1987; Cedergren y Grosjean, 1987) tomando como base ésta y otras evidencias que a continuación se enumeran (Lazcano *et al.*, 1988):

1. El grupo 2'OH de la ribosa parece está involucrado en varias reacciones prebióticas de condensación y fosforilación (Halmann *et al.*, 1969), además de jugar un papel catalítico directo en las enzimas de RNA (Weiner, 1987; White y Erickson, 1981).
2. La biosíntesis de desoxirribonucleótidos se lleva acabo mediante la reducción enzimática de ribonucleótidos tanto en procariontes (arqueobacterias y eubacterias) como en eucariontes, lo que sugiere que la biosíntesis de éstos antecede evolutivamente a la de los desoxirribonucleótidos.
3. Las coenzimas de piridín-nucleótidos y los cofactores ribonucleotídicos están ampliamente distribuidos en las vías metabólicas, y son indispensables para la actividad catalítica de al menos 50 % de las enzimas que las presentan (White, 1976).
4. La polimerización de formaldehído produce ribosa en bajas cantidades, pero nunca desoxirribosa (Weiner, 1987).
5. La síntesis de proteínas puede conducirse, *in vivo* (virus de la polio) e *in vitro*, en ausencia de DNA pero no de RNA.
6. El RNA tiene capacidad de almacenar información genética como ocurre en múltiples virus y en viroides.
7. Los grupos hidroxilo 2' y 3' juegan un papel estructural en el RNA, donde están involucrados en varios puentes de hidrógeno poco usuales que permiten el plegamiento de ésta molécula (por ejemplo en el tRNA) para crear superficies catalíticas formando una variedad de estructuras secundarias y terciarias.

8. Se conocen múltiples casos en los que moléculas de RNA presentan actividad catalítica, incluyendo la ruptura y formación de enlaces covalentes en otras moléculas o sobre sí misma. Así la subunidad de RNA de la Ribonucleasa P de *E. coli* y de *Bacillus subtilis* es capaz, por sí misma, de romper el enlace covalente del tRNA para lograr su maduración (Guerrir-Takada *et al.*, 1983; Guerrir-Takada y Altman, 1984; Gardiner *et al.*, 1985); el intrón L-19 de *Tetrahymena thermophila* puede autoescindirse, uniendo covalentemente a los dos exones que lo flanquean y cerrándose sobre sí mismo formando un círculo covalentemente cerrado (Krug *et al.*, 1982; Cech *et al.*, 1982; Zaug y Cech, 1982; Zaug *et al.*, 1983), este mismo intrón es capaz de polimerizar citosina formando poli(C) al utilizar como sustrato ácido pentacitídico (pC5) según el reporte de Zaug y Cech (1986); se sabe que el Glu-tRNA interviene en la biosíntesis de clorofila (Schön *et al.*, 1986); en otros catalizadores celulares con subunidades de RNA, es ésta precisamente la que tiene actividad catalítica (ver, por ejemplo, Shvedova, *et al.*, 1987).

No obstante, las concentraciones de ribosa que se obtienen en experimentos de síntesis abiótica son muy bajas, lo que ha llevado a pensar que quizá algún otro tipo de polímero antecedió a su vez al RNA. Se han propuesto diversos análogos de ácidos nucleicos donde se sustituye a la ribosa por moléculas acíclicas como el glicerol (Schwartz y Orgel, 1985; Schwartz *et al.*, 1987; Joyce *et al.*, 1987; Vischer y Schwartz, 1988; Vischer *et al.*, 1989)

En cualquier caso, los sistemas replicativos relevantes para la evolución celular debieron formar parte de un sistema autopoietico, una de cuyas características es la delimitación del medio que le rodea y que como ya vimos es una condición para la existencia de selección natural; en todas las células actuales la barrera física está constituida por una bicapa lipídica. Por esta razón y debido a que: 1) se han encontrado lípidos y ácidos grasos en meteoritos, con la reserva de que podrían ser contaminantes (Oró *et al.*, 1990), y se han obtenido en reacciones abióticas, por una parte; 2) los lípidos en solución acuosa son capaces de formar espontáneamente estructuras más o menos esféricas con bicapas lipídicas denominadas liposomas, estas se han propuesto como el origen de las membranas celulares (Deamer y Oró, 1980).

## EVOLUCION DE LOS MECANISMOS REPLICATIVOS EN SISTEMAS AUTOPOYETICOS

Algunos análogos de nucleótidos presentan actividad catalítica (Zielinski y Orgel, 1987); si bien estos compuestos pudieron ser importantes solo en la sopa primitiva, se puede sugerir también que existieron sistemas formados por una bicapa lipídica o liposoma que contenía en su interior análogos de polinucleótidos autocatalíticos, capaces de autorreplicarse por su capacidad de unir monómeros de los análogos por complementariedad de sus bases, y catalizar su unión covalente en forma similar a la del polímero que sirvió de molde.

Este tipo de moléculas habrían sido sustituidas posteriormente por RNAs autocatalíticos dentro de tales sistemas; tal vez en ambos casos dentro de la membrana también habría polifosfatos, cationes metálicos y aminoácidos, entre otros. Como en el primer caso, el RNA sería la molécula informativa y replicativa, pero ahora su gran versatilidad estructural permitiría el desarrollo de actividad heterocatalítica inicialmente sobre otros RNAs, pero más tarde seguramente sobre otro tipo de moléculas. Esta capacidad de catalizar reacciones sobre otro tipo de moléculas habría originado en particular un sistema primitivo (formado por varios tipos de RNAs) de síntesis de proteínas; las proteínas sintetizadas por este sistema habrían permitido

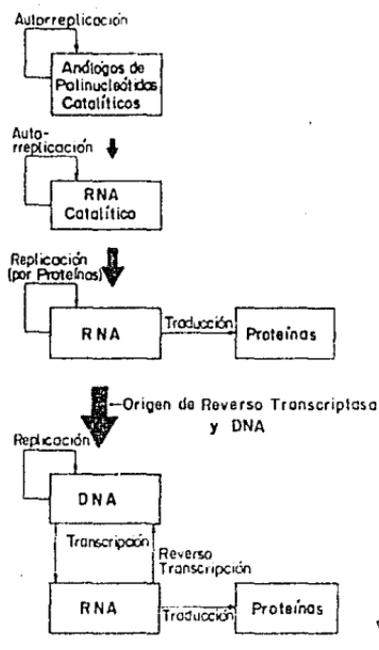
mayor especificidad y precisión en los catalizadores de RNA al actuar como estabilizadores de dichas moléculas y mejorando a su vez el sistema de síntesis de tales proteínas.

En este momento habrían surgido transportadores de moléculas a través de la membrana, así como las primeras vías de síntesis de ribonucleótidos y de aminoácidos. Todos estos catalizadores serían una combinación de RNA y proteínas de acuerdo con la hipótesis de White (1976; 1982), quien propuso que en un principio los catalizadores fueron de RNA, posteriormente de RNA y proteínas, finalmente las proteínas se transformaron en el componente fundamental, quedando en muchos casos un componente vestigial, derivado de ribonucleótidos, o un ribonucleótido, como coenzima que suele ser muy importante en la catálisis. Es decir, al aparecer la síntesis de proteínas, se habría originado una replicasa formada de RNA y proteínas; la selección natural habría provocado el surgimiento de un sistema de síntesis de proteínas más preciso, donde participaron las propias proteínas, dando como resultado una amplia diversidad de catalizadores proteicos, desplazando en gran medida al RNA de su papel catalítico y dejándolo fundamentalmente como molécula informativa (White, 1976; White y Erickson, 1981). Al ocurrir este desplazamiento la replicasa quedaría formada solamente por una molécula proteica. En estos sistemas autopoyéticos habría surgido la traducción como la conocemos actualmente así como la estructura básica del ribosoma formado de RNA y proteínas, al mismo tiempo que el tRNA y el código genético. En este punto las funciones se habrían dividido entre moléculas de distinta naturaleza en las células: polirribonucleótidos como moléculas informativas y proteínas como catalizadores.

El establecimiento de las proteínas como catalizadores abrió la posibilidad de diversificar las vías metabólicas y entre estas apareció la reducción de ribonucleótidos, en una enzima capaz de sintetizar desoxirribonucleótidos. Una vez que aparecieron este tipo de nucleótidos, la replicasa habría podido incorporarlos, debido a su baja especificidad, utilizando un molde de RNA. Una duplicación génica pudo haber permitido que cada una de las copias incorporara solo un tipo de nucleótidos; la que llegó a incorporar solo desoxirribonucleótidos sería la primera reverso transcriptasa, que a su vez daría origen a las DNA polimerasas DNA dependientes cuando se dió la capacidad de usar como molde un DNA. Así el DNA pasó a ser la molécula informativa y fue necesaria la aparición de RNA polimerasas DNA dependientes, es decir, aparece la transcripción y el RNA queda relegado a un papel de intermediario entre la molécula informativa, capaz de replicarse (el DNA) y los catalizadores (las proteínas).

En realidad cada uno de estos cambios evolutivos estuvo favorecido por la selección natural; así, el paso de análogos de polinucleótidos a ribonucleótidos quizá se debió a ciertas ventajas físicoquímicas (Joyce *et al.*, 1987) de los RNAs, como una mayor estabilidad; la síntesis de proteínas y el desplazamiento del RNA por estas como catalizadores se vió favorecida por la gran diversidad de catalizadores altamente específicos que pueden generarse mediante la combinación de 20 monómeros distintos y todas las longitudes posibles (Alberts, 1986; Gilbert, 1986; Lazcano, 1986). Finalmente la aparición del DNA traería como ventajas la posibilidad del surgimiento de mecanismos de reparación, de la actividad correctora en las DNA polimerasas, haciendo que la replicación de la información se convirtiera en un proceso de alta fidelidad por un lado, mientras que la estructura rígida del DNA la haría menos susceptible a la mutación por radiación ultravioleta (efecto hipocrómico) debido al apilamiento de las bases (Lazcano *et al.*, 1983a). En la Figura 3 se ilustran algunas de las fases importantes en todo este largo proceso de evolución de los genomas celulares.

## FLUJO DE INFORMACION



## ORIGEN DE LOS PROCESOS DEL FLUJO DE INFORMACION

### REPLICACION

Encapsulación de análogos de poli-nucleótidos autocatalíticos en liposomas. Primeros sistemas autopoyéticos.

### REPLICACION

Sustitución de los análogos por RNA's autocatalíticos en los sistemas anteriores. Células con genoma de RNA y ribozimas.

### TRADUCCION

Células con genoma de RNA y enzimas proteicas. Origen de la ribonucleótido reductasa, la desoxirribosa y la Reversa Transcriptasa.

### TRANSCRIPCION

Células con DNA de doble hélice, RNA y proteínas. RNA polimerasa DNA dependiente y DNA polimerasa DNA dependiente. Mecanismos de reparación y actividad correctora de la DNA polimerasa.

Figura 3. EVOLUCION DEL FLUJO DE LA INFORMACION GENETICA. Evolución del flujo de la información genética en sistemas autopoyéticos y origen de los procesos de replicación, transcripción y traducción. Después de la aparición de las proteínas y de las primeras replicasas proteicas aparece la reversa transcriptasa como uno de los requisitos previos para la aparición y establecimiento del DNA como material genético en todas las células ( Darnell y Doolittle, 1986; Lazcano, 1986 ).

## ORIGEN DE LA TRANSCRIPCION INVERSA

Se ha propuesto que la transcripción inversa debe haber surgido antes que ocurriera la divergencia evolutiva entre procariontes y eucariontes (Doolittle *et al.*, 1989), sin embargo es posible que su origen no solo sea anterior a la divergencia arqueobacterias-eubacterias sino que preceda a la aparición misma del DNA (Darnell y Doolittle, 1986; Varmus, 1987; Weiner, 1987; Wintersberger y Wintersberger, 1987; Lazcano *et al.*, 1990), de acuerdo con la hipótesis de que el RNA antecedió al DNA; sin este tipo de actividad no es posible explicar

la transición hacia genomas de DNA. Pero si este proceso es realmente tan antiguo y las moléculas que actualmente lo llevan a cabo son descendientes directas de aquellas en las que surgió, entonces el estudio de las características del proceso y de las RT's puede proporcionar información sobre el origen y evolución de estas moléculas, así como sobre este importante período de transición en la evolución celular que dió origen al más reciente ancestro común de todos los seres vivos.

### LA REVERSO TRANSCRIPTASA

Las RT's son enzimas con actividad de DNA polimerasa RNA dependiente y de DNA polimerasa DNA dependiente, que fueron descubiertas en virus (Temin y Mizutani, 1970; Baltimore, 1970), lo que hizo pensar que el fenómeno de transcripción inversa estaba restringido a los retrovirus; por lo cual durante muchos años no se desarrollaron estudios acerca de su origen y evolución. Sin embargo, en la década pasada se encontró que existe una amplia variedad de entidades génicas en las que se presenta al menos un marco de lectura abierta con alto porcentaje de similitud con las reverso transcriptasas conocidas.

Entidad	Organismo	Reino
Retrovirus	aves y mamíferos	Animal
VL30	roedores	Animal
IAP	roedores	Animal
Virus de la Hepatitis	aves y mamíferos	Animal
Elementos LINE	mamíferos	Animal
Factor I	<i>D. melanogaster</i>	Animal
Factor F	<i>D. melanogaster</i>	Animal
Elemento móvil 17.6	<i>D. melanogaster</i>	Animal
Elemento móvil 297	<i>D. melanogaster</i>	Animal
Elemento móvil 412	<i>D. melanogaster</i>	Animal
Elemento móvil Gypsy	<i>D. melanogaster</i>	Animal
Virus del mosaico de la coliflor		Plantas
Virus del anillo encarnado		Plantas
Elemento móvil BS1		Plantas
Factor Ing-3	Tripanosomas	Protistas
Elemento móvil TY-3	Levaduras	Protistas
Intrones mitocondriales Clase II		Hongos
Plasmidos mitocondriales		Hongos
RT celular	<i>E. coli</i>	Procariontes
RT celular	<i>M. xantus</i>	Procariontes

Tabla 1. Entidades génicas que contienen un marco de lectura abierta correspondiente a una reverso transcriptasa. Es notable que estas entidades interactúan o forman parte del genoma de algún organismo de cualquiera de los 5 reinos de organismos reconocidos por Margulis y Schwartz (1982); es decir las entidades génicas con RT están distribuidas entre organismos de los 5 reinos. Los datos se tomaron de Doolittle, et al. (1989) y de Lampson et al. (1989).

Este tipo de entidades, que están ampliamente distribuidas (Tabla 1), prácticamente en todos los reinos de organismos (Lazcano et al., 1990), han sido denominadas en conjunto

como retroides (Fuetterer y Hohn, 1987), y entre ellas se cuentan los retrovirus endógenos y exógenos, retrotransposones, caulimovirus, hepadnavirus, elementos LINE, intrones mitocondriales de hongos, elementos genéticos de bacterias, etcétera (Doolittle *et al.*, 1989)

### Dominios funcionales y evolución molecular

La RT es un proteína de bajo peso molecular que fluctua entre 50 y 95 kDa. Aunque en la mayoría de los casos esta formada por un solo polipéptido, existen casos en que son 2 subunidades homólogas, posiblemente una de ellas producto del procesamiento de la más grande ya que su extremo amino terminal es común (Verma, 1977); algunas de las que se han logrado purificar y caracterizar, se enlistan en la Tabla 2.

RT del Virus:	Subunidad	
	$\alpha$	$\beta$
ASLV	58	92
MLV	70-84	-
HaLV	58	68
C	70	-
MOPC-315	26.5	28
REV	70-84	-
MMTV	100	-
MPMV	85-100	-
AMV	65	95

Tabla 2. Composición y peso molecular de las RTs de algunos retrovirus. ASLV, virus relacionados con el sarcoma de aves; MLV, virus de leucemia de murinos; HaLV, virus de leucemia de hamster; C, retrovirus tipo C de mamíferos; MOPC-315, virus endógeno del ratón; REV, virus de retículo endoteliosis; MMTV virus de los tumores de murinos, AMV virus de los tumores del mieloma de aves, MPMV virus de monos Mason-Pfizer. Los datos se tomarán de Varmus y Swanstron (1982), y de Verma (1977).

Se ha sugerido que todas las RT's son de origen monofilético, ya que al analizar su estructura primaria se encuentra una similitud muy grande (Xiong y Eickbush, 1988; Doolittle *et al.*, 1989; Lazcano *et al.*, 1989); aunque se han identificado varias secuencias muy similares, existe en particular una zona especialmente conservada (Tabla 3) hacia la región amino terminal, que consiste en una secuencia de 14 residuos de aminoácidos hidrofóbicos con un par de residuos de ácidos aspárticos en el centro y cuya configuración se ha estudiado mediante cálculos teóricos resultando la estructura horquilla beta que aparece en la Figura 4.

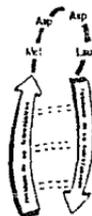


Figura 4. ESTRUCTURA DEL DOMINIO DD. Posible estructura horquilla beta de la secuencia conservada en reverse transcriptas denominada dominio DD de acuerdo con los resultados de un análisis de estructura secundaria de dichas secuencias. Modificado a partir de Argos (1988).

1	FRMIAYGD DVIASY	Coxsackievirus B3
2	DRLLFSGD DSLAFS	Virus del mosaico del pepino
3	NFVVASGD DSLIGT	Virus del mosaico de la alfalfa
4	LRILCYGD DVLIVF	Virus de la Hepatitis A
5	LKMIAYGD DVIASY	Virus de la polio
6	TILOYMD DILLAS	HTLV-I
7	TIVQYMD DILLAS	HTLV-II
8	CMLHYMD DILLAA	Virus del sarcoma de rous
9	VIYOYMD DLYVGS	HIV-1
10	IIIQYMD DILIAS	HIV-2
11	SMRIIYGD TDSIFVL	HSV
12	QLRVIYGD TDSLFI	EBV
13	EDFIAAGD TDSVYVC	T4
14	NLEVIYGD TDSIMIN	Gen humano alfa
15	RERSVYGD TDSVETE	Virus de vaccinia

Tabla 3. Secuencia del dominio DD de 15 polimerasas: 1 a 5 RNA polimerasa; 6 a 10 reverse transcriptasas; 11 a 15 DNA polimerasas (Doolittle et al., 1989; Argos, 1988).

Esta región ha sido denominada dominio DD y se encuentra también en todas las RNA polimerasas celulares y en muchas virales (Argos, 1988; Lazcano *et al.*, 1988b). En muchas DNA polimerasas esta región está modificada a DTD (Argos, 1988; Wong *et al.*, 1988; Wang *et al.*, 1989). Entre las evidencias experimentales del papel funcional del dominio DD se cuentan: 1) anticuerpos dirigidos contra una región de la proteína PG11 del fago T7, cuya secuencia es muy similar a la del dominio DD, son capaces de inhibir la actividad de la RNA polimerasa de *E. coli* (el dominio DD se presenta en su subunidad  $\beta'$ ) y la RT del virus de mieloma de aves (Zavriev y Borisova, 1987); 2) estudios mutacionales de la RT del virus de murinos (MLLV) indican que el sitio activo se encuentra hacia la región amino terminal de la enzima igual que el dominio DD (Tanese y Goff, 1988); 3) un residuo de lisina de esta región de la RT de MMLV está directamente involucrada en el sitio de unión al sustrato (Basu *et al.*, 1987); 4) la QB replicasa de colifagos mutantes donde una glicina adyacente al par DD se substituye por Ala, Ser, Pro, Met o Val, pierde su actividad polimerizante (Inokuchi y Hirashima, 1987); 5) la substitución de la Tyr conservada del dominio DD de la RT del VIH-1 por una pequeña secuencia de 5 aminoácidos inhibe por completo su actividad polimerizante (Hizi *et al.*, 1988); 6) un polipéptido de 51 a 52 kDa que parece ser producto de la remoción del extremo carboxilo de la RT del VIH-1 (64 kDa) presenta actividad de reverse transcriptasa (Di Marzo Varonese *et al.*, 1986; Lightfoot *et al.*, 1986; Le Grice *et al.*, 1987) indicando que dicha región no es necesaria en la reacción catalítica.

La importancia de dicho dominio se manifiesta también en su notable conservación evolutiva, a pesar de ser parte de proteínas codificadas por genomas de RNA, que como se ha visto cambian mucho más rápidamente que los de DNA (Holland *et al.*, 1982). Además entre todas las proteínas codificadas por retrovirus la que tiene la tasa de cambio más baja es precisamente la RT (McClure *et al.*, 1988; Doolittle *et al.*, 1989). La similitud de este dominio altamente conservado y su presencia en prácticamente todas las polimerasas sugiere que este conjunto de enzimas son de origen común a partir de una pequeña enzima proteica con actividad de RNA polimerasa RNA dependiente o replicasa. Sucesivas duplicaciones génicas con adición de nuevos polipéptidos habrían dado origen a la diversidad de polimerasas multiméricas tanto celulares como virales que conocemos actualmente; la adición de nuevas subunidades o de segmentos al mismo polipéptido habrían sido suficientes para que las nuevas polimerasas se

adaptaran a la diversas combinaciones molde-sustrato que se dieron durante la evolución del genoma de las células.

### El origen antiguo de la Reverso Transcriptasa

Aunque es claro que algunos retrovirus son de origen reciente, tal vez no más de 300 años para el VIH-1 (Smith *et al.*, 1988; Doolittle, 1990), esto no implica que sus componentes también lo sean, en particular sus RT's.

Si consideramos la hipótesis de que los virus surgen continuamente a partir de las células de los organismos a los que infectan y que otros brincan de huésped en huésped, entonces es posible que el gen que codifica para la RT haya permanecido desde su origen, durante la transición RNA-DNA en el Arqueano, dentro de las células, encontrándose actualmente en diversos genomas celulares y virales de varias líneas evolutivas que incluyen organismos procariontes (Lampson *et al.*, 1989; Inouye, *et al.*, 1989; Temin, 1989). En el caso de la cepa clínica *E. coli* B se ha mostrado que el uso de codones para su RT sugiere que esta proteína puede ser de aparición reciente en dicha cepa debido a algún proceso de transmisión horizontal de genes (Varmus, 1989).

Una característica notable de las RT's es su alta tasa de error (Preston *et al.*, 1988; Roberts *et al.*, 1988); así, como se muestra en la Tabla 4, las RNA polimerasas DNA dependientes y las DNA polimerasas no solo tienen una tasa de error mucho más baja, sino que además estas últimas suelen tener actividad correctora. La fidelidad en la lectura de moldes por las polimerasas está determinada por algunas variables que se describen a continuación: 1) prevención de errores, donde la selectividad del nucleótido correcto puede ser alcanzada mediante factores que aumentan la rigidez de la conformación del complejo molde-sustrato; tales factores pueden ser las proteínas que se unen al DNA o las que se unen a la polimerasa; 2) corrección repetitiva mediante actividad exonucleasa que puede estar en la misma polimerasa o puede ser una proteína diferente (Loeb y Zakour, 1980). Si estos factores y propiedades involucradas en la fidelidad se han originado a lo largo de la evolución, entonces la alta tasa de error de la RT puede ser considerada como una evidencia más de su antigüedad, ya que las primeras polimerasas tal vez fueron altamente inespecíficas (con un amplio espectro de sustratos posibles), y a la vez tenían una alta tasa de error que llegó al mínimo con la aparición de la actividad correctora en DNA polimerasas.

Por otro lado, se sabe que la RT es incapaz de desplazar una de las hebras de una molécula de doble hélice para usar la otra como molde y polimerizar nucleótidos, lo que sugiere que desde su origen fué una enzima que utilizaba siempre moldes de una sola hebra; tal vez RNA de cadena sencilla, con muy poca estructura secundaria. El proceso de elongación es además entre 10 y 1000 veces más lento en las RT's que en las DNA polimerasas (Edenberg y Huberman, 1975), lo que también apoya la idea de que la RT es un catalizador muy antiguo, por su baja eficiencia.

Se han reportado muchas otras actividades enzimáticas para la reverso transcriptasa que incluyen: proteín-cinasa (Strand y August, 1971), nucleótido cinasa, fosfatasa, hexocinasa, deshidrogenasa láctica (Mizutani y Temin, 1971), ribonucleasa (Hung, 1971), DNA ligasa (Mizutani *et al.*, 1971) y desoxirribonucleasa (Mizutani *et al.*, 1970). En realidad estas actividades no han sido caracterizadas sin lugar a dudas; sin embargo, si realmente existen esto querría decir que la RT es una enzima multifuncional, característica que resultaría ventajosa para las

primeras células. Esto podría estar relacionado con el hallazgo del dominio DD en otro tipo de proteínas con actividades diferentes (Argos, 1988).

### CATIONES METÁLICOS Y POLIMERASAS

Las polimerasas son enzimas dependientes de  $Mg^{++}$  para su actividad ya que este metal coordina a la enzima con su sustrato mediante la formación de un complejo enzima-metal-sustrato (Sloan *et al.*, 1975). Se ha visto que este cofactor puede ser sustituido *in vitro* por otros cationes metálicos ( $Mn^{++}$ ,  $Ni^{++}$ ,  $Co^{++}$ ) lo cual resulta, para la mayoría de los casos, en una disminución en la eficiencia de incorporación con respecto a la que se da en presencia de magnesio. No obstante, la actividad de la RT del virus de la leucemia de murinos (MMLV) se eleva hasta cuatro veces en presencia de  $Mn^{++}$  cuando se utiliza el complejo poli(A)-oligo(dT) como molde-cebador (Verma, 1977), y se ha reportado que dicho cofactor eleva la actividad de las RT's de retrovirus tipo C (Sargadharan *et al.*, 1976).

Polimerasa	$Mg^{++}$	$Mn^{++}$ (2mM)
AMV-RT	1/1689	1/500
DNA Pol I de <i>E. coli</i>	1/20000	1/1000
DNA Pol $\alpha$	1/6000	1/300
DNA Pol $\beta$	1/20000	1/2000

Tabla 4. Tasas de error de polimerasas. Las polimerasas con la tasa de error más alta son las reverse transcriptasas. La presencia de manganeso eleva la tasa de error, tomado de Loeb y Zakour, (1980).

El cofactor sustituyente más estudiado hasta hoy es el  $Mn^{++}$  y se observa que tiene varios efectos importantes en la actividad de las polimerasas. El manganeso es capaz de multiplicar la tasa de error en las polimerasas por factores de 10 o mayores en algunos casos (Tabla 4). Otro efecto importante es que provoca un cambio en la especificidad de sustrato de estas proteínas, así como la capacidad de usar como moldes polinucleótidos no específicos para su actividad; en la Tabla 5 se enlistan los casos conocidos de cambio de sustrato y de molde en polimerasas.

Polimerasa	Actividad Inducida	Cambio en la utilización de sustrato	% de su actividad normal	Referencia(s)
DNA Pol de <i>E. coli</i>	Síntesis de los polímeros mezclados	molde	-	Berg, <i>et al.</i> , 1963
DNA Pol I	Reverse Transcriptasa	molde	6 %	Loeb, <i>et al.</i> , 1973; Karkas, 1973
RNA Pol del Fago T7	Replicasa	molde	-	Konarska y Sharp, 1989
RNA Pol de <i>E. coli</i>	Replicasa	molde	10 %	Biebricher y Orgel, 1973; Laca, <i>et al.</i> , 1987
RT del VIH-1	Replicasa	sustrato	45 %	Valverde <i>et al.</i> , 1989; este trabajo
RT del AMV	Replicasa	sustrato	30 %	este trabajo

Tabla 5. Cambio de sustrato y molde de polimerasas. En varias polimerasas se ha logrado inducir pérdida de especificidad de sustrato y de molde; la eficiencia de la actividad inducida es diferente para cada polimerasa.

Por otra parte el manganeso cataliza la oligomerización de análogos de nucleótidos más eficientemente que el magnesio (Vischer y Schwartz, 1989). Lo anterior sugiere que el manganeso jugó un papel importante tanto en reacciones polimerizantes en la sopa primitiva,

como en las primeras células, contribuyendo a la polimerización de moléculas capaces de almacenar información genética.

### LA REVERSO TRANSCRIPTASA DEL VIH-1

La reverso transcriptasa del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 forma parte del virión infectivo como se muestra en la Figura 5.

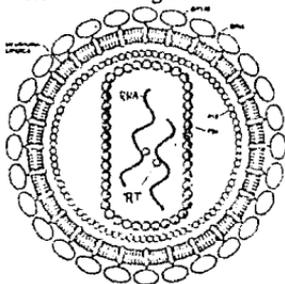


Figura 5. VIRION DEL VIH-1. Estructura del virión del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1, en el cual se encuentran varias copias de la reverso transcriptasa unidas a dos copias del RNA viral en la parte más interna del virión. Tomado de Gallo (1987).

Al ser liberada junto con el RNA viral en el interior de la célula, sintetiza una molécula de doble hélice de DNA, utilizando como molde inicial el RNA viral cebado con el tRNA correspondiente a la lisina. En el genoma del virus la RT está situada dentro de un marco de lectura abierta llamado gen *pol* que codifica para una poliproteína (Figura 6); una vez sintetizada dicha poliproteína es procesada produciendo una proteasa de 10 kDa, una exonucleasa-integrasa de 34 kDa y la RT de 64 kDa (Leuthardt y Le Grice, 1988).

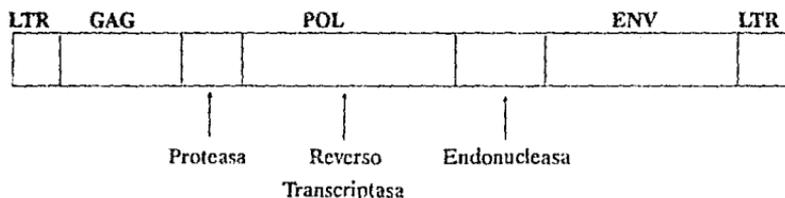


Figura 6. GENOMA DEL VIH-1. Localización del gen de la reverso transcriptasa en el genoma del virus del SIDA; forma parte del gen estructural *pol*, se encuentra entre la proteasa y la endonucleasa.

Aunque se ha reportado que la RT tiene un peso molecular de 66 kDa y suele copurificar con un polipéptido de 52 kDa que también presenta actividad enzimática (Di Marzo Varonese *et al.*, 1986; Larder *et al.*, 1987), para este trabajo se utilizó un vehículo de expresión que produce una RT de 64 kDa (Le Grice *et al.*, 1987).

Por otro lado, en este momento resulta importante estudiar el comportamiento de una enzima clave en el ciclo replicativo del virus del SIDA (RT del VIH-1), enfermedad de origen reciente y que se ha convertido en una pandemia entre la población humana causando serios estragos.

## UN MODELO DE REPLICASA ANCESTRAL

Si la hipótesis de que todas las polimerasas son de origen monofilético y además se originaron a partir de una replicasa ancestral (Lazcano *et al.* 1988b), entonces es posible encontrar alguna actividad remanente de replicasa en la RT mediante la inducción de algunos cambios.

Se ha propuesto que la actividad de replicasa encontrada en la RNA polimerasa de *E. coli* (Llaca *et al.*, 1987) es una actividad vestigial, concibiendo a esta enzima como un modelo de replicasa ancestral. Debido a que la subunidad B' de dicha enzima presenta homología con al menos una subunidad de las RNA polimerasas de arqueobacterias, eubacterias y eucariontes (Zillig *et al.*, 1985), se ha pensado que en tal subunidad reside la actividad catalítica y debe tener también, por sí misma, actividad de replicasa (Llaca *et al.*, 1987); sin embargo, esto no se ha probado experimentalmente.

Si la RT desciende directamente de las replicasas ancestrales y presenta actividad enzimática propia de las replicasas, resultaría un mejor modelo de replicasa ancestral ya que es monomérica y de bajo peso molecular a diferencia de las RNA polimerasas mucho más complejas estructuralmente.

Este trabajo pretende aportar evidencias experimentales acerca del origen y antigüedad de la RT; así como respecto a la etapa de transición de genomas de RNA a DNA. Para lograr estos objetivos se desarrolló la siguiente estrategia experimental:

- 1) Sobreproducción de la RT del VIH-1 con un vector de expresión en bacterias,
- 2) Purificación parcial de la misma e identificación mediante ensayos de transcripción inversa con nucleótidos marcados radioactivamente,
- 3) Caracterización de las condiciones óptimas de ensayo para la RT parcialmente purificada y
- 4) Inducción de actividad de replicasa en esta enzima y caracterización de las condiciones de ensayo para dicha actividad.

## MATERIALES Y METODOS

### Bacterias y Plásmidos

Para obtener la Reverse Transcriptasa del VIH-1 (RT) se utilizó la cepa M15 de *E. coli* transformada con dos plásmidos, el pDML1 y el pRT/CG (donada por el Dr. S. F. J. Le Grice). El primero contiene el gen para la neomicina fosfotransferasa que confiere resistencia a kanamicina como marcador selectivo, el gen *lacI* que está sobreproduciendo el represor *lac*, y el replicón p15A que es compatible con otros vectores de expresión (Certa *et al.*, 1986); pRT/CG contiene el elemento PN25\*<sub>0</sub>, que es una fusión del promotor PN25 del bacteriófago T5 con del operador *lac* de *E. coli* (Peschke *et al.*, 1985), un sitio sintético de unión al ribosoma (*sur*), el terminador t1 del operón *rrnB* de *E. coli* (Brosius *et al.*, 1981), el fragmento PvuII-EcoRI de pBR322 (Bolivar *et al.*, 1978) con el origen de replicación, y el gen que codifica para la proteína periplásmica  $\beta$ -lactamasa que confiere resistencia a ampicilina (Stüeber *et al.*, 1984). Entre el *sur* y el t1 se encuentra el marco de lectura abierta de la poliproteína (gen *pol*) del VIH-1 que corresponde al fragmento *BgIII-NdeI* del provirus HTLV-III B (Ratner *et al.*, 1985); la estructura de pRT/CG se muestra en la Figura 7 indicando la

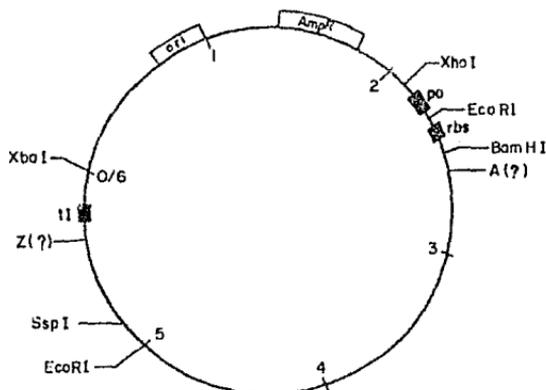


Figura 7. MAPA DEL PLASMIDO pRT/CG. Estructura del plásmido utilizado para producir la reverse transcriptasa del VIH-1: se muestran algunos sitios de restricción y secuencias reguladoras como el elemento promotor-operador (*po*), el sitio de unión al ribosoma (*rbs*) y el terminador (*t1*). Entre A y Z se encuentra clonado el gen *pol* del virus del SIDA

posición de los genes anteriores y algunos sitios de restricción (Leuthardt y Le Grice, 1988).

El represor *lac* producido continuamente por pDML1 actúa sobre el operador *lac* que se encuentra en pRT/CG impidiendo la transcripción del gen *pol*, de modo que para inducir la transcripción se agrega IPTG (isopropil- $\beta$ -D-galactopiranosido) al medio donde se encuentran las bacterias. Este inductor se une e inactiva al represor permitiendo la transcripción. Una vez producido el transcrito se traduce a partir de él una poliproteína de 115 KDa que posteriormente se autoprocresa dando como resultado final una proteasa de 10KDa, una

exonucleasa-integrasa de 35KDa y la RT de 64KDa. En la Figura 8 puede apreciarse un esquema de la inducción y el procesamiento de la poliproteína.

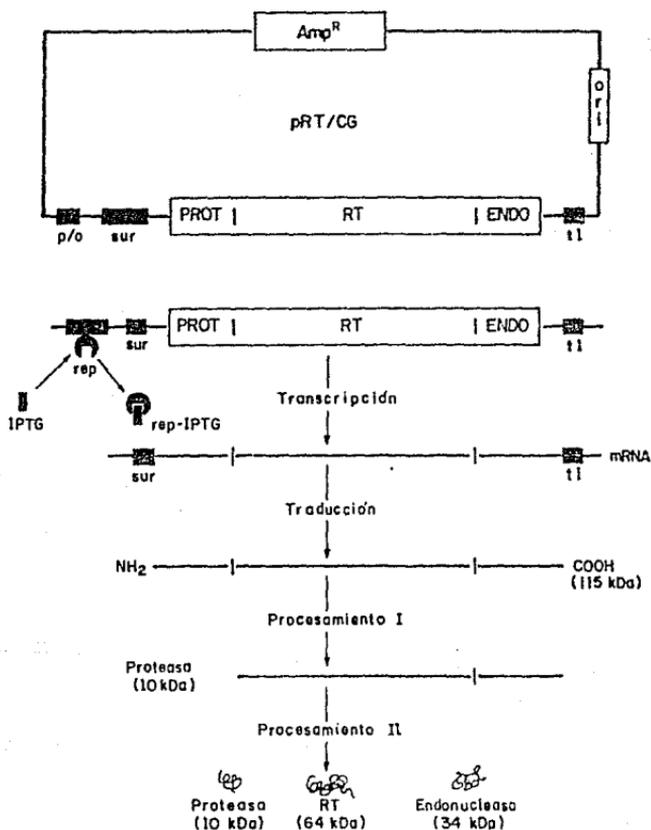


Figura 8. EXPRESION DE LA RT. Esquema de la inducción de la transcripción y el procesamiento de la poliproteína, que da como resultado la producción de una reverso transcriptasa madura y funcional a partir del vector pRT/CG dentro de *E. coli*. Promotor- operador (*p/o*); sitio de unión al ribosoma (*sur*); terminador (*t1*); represor (*rep*).

## Reactivos

Los siguientes reactivos fueron adquiridos en SIGMA: peptona, extracto de levadura, glucosa, NaCl, agar, tris-HCl, tris base, sacarosa, etilén diamín tetra-acetato (EDTA), Lisozima, tritón X-100, polietilenglicol 6,000, polietilenglicol 8,000, cloruro de litio, etanol absoluto, acetato de amonio, cloroformo, alcohol isoamílico, agarosa, bromuro de etidio, azul de bromofenol, xilencianol, glicerol, MgCl<sub>2</sub>, ampicilina, kanamicina, isopropil-B-D-(tiogalactopiranosido) (IPTG), DTT, sulfato de estreptomina, dGTP, GTP, tolueno, etanol, dodecil sulfato de sodio, β-mercaptoetanol, TEMED, persulfato de amonio (APS), acrilamida, bis-acrilamida, azul brillante de Coomassie (R-250), metanol, ácido acético, NaOH, NH<sub>4</sub>OH, AgNO<sub>3</sub>, ácido cítrico, formaldehído, ácido nítrico, MnCl<sub>2</sub>, KCl, reverse transcriptasa del Virus de la Mieloma de Aves (AMV-RT), pirofosfato de sodio (Na<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O) y fosfato disódico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O). Las enzimas de restricción *Hind III*, *Eco RI* y *Xho I* se adquirieron en Bio Labs; los filtros DE-81 en Whatman; el oligo(dG)<sub>10</sub>, el poli(1C) y el DEAE-Sephaell en Pharmacia; el 2,5-fenil-oxazol (PPO) y el p-bis-[2,5-feniloxazolil]benceno (POPOP) en New England Nuclear. El material radioactivo (<sup>α-32</sup>P]GTP y [<sup>α-32</sup>P]dGTP) se adquirió en Amersham.

## Soluciones

### a) Purificación de Plásmido y Electroforesis en Gel de Agarosa

- TS: tris-HCl 50mM, pH 7.5; sacarosa 25%.
- ELT: EDTA 100mM; Lisozima 2mg/ml; tritón x-100 0.1%.
- PEG 20%: polietilenglicol 6,000 20%; NaCl 1M.
- PEG 13%: polietilenglicol 8,000 13%; NaCl 1.6M.
- TE: tris.HCl 10mM, pH 8.0; EDTA 1M.
- TBE: tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM y EDTA 2 mM.
- Colorante: azul de bromofenol 0.02%; xilencianol 0.02% y glicerol 50%.
- Bromuro de etidio: 10mg/ml.

### b) Corte con Enzimas de Restricción

- Para reacción con *Eco RI*: NaCl 50mM, Tris-HCl(pH 7.5) 100mM y MgCl<sub>2</sub> 10mM.
- Para reacción con *Xho I*: NaCl 50mM, tris-HCl(pH 7.9) 10mM y MgCl<sub>2</sub> 10mM.

### c) Purificación Parcial de RT

- Lisis: tris-HCl 50mM, pH 7.5; NaCl 0.3M y EDTA 0.5M.
- Diálisis: tris-Cl 50mM, pH 8.0; EDTA 1mM; DTT 1mM; tritón X-100 0.1% (v/v); NaCl 25mM y glicerol 10% (v/v).
- Remoción de ácidos nucleicos: tris.HCl 50mM, pH 8.0; EDTA 1mM; DTT 1mM; NaCl 25mM; glicerol 10% y sulfato de estreptomina 5% (p/v), preparado al momento de usarlo.
- Elución: tris.HCl 50mM, pH 8.0; EDTA 1mM; DTT 1mM; NaCl 25mM y glicerol 10% (v/v).

- Concentración: tris.HCl 50mM, pH 8.0; EDTA 1mM; DTT 1mM; NaCl 25mM tritón X-100 0.1% (v/v) y glicerol 50% (v/v).
- d) Electroforesis en Gel de Poliacrilamida
- SGB: tris-HCl 1M, pH 6.8; dodecil sulfato de sodio 0.8%.
  - RGB: tris-HCl 1.9M, pH 8.8; dodecil sulfato de sodio 0.5%.
  - Para muestra: tris-HCl 0.4M, pH 6.8; dodecil sulfato de sodio 10%; β-Mercaptoetanol 25%; azul de bromofenol 0.5% y glicerol 9%.
  - Corrida: tris base 250mM; glicina 144.1mg/ml; y dodecil sulfato de sodio 0.01%.
  - A25: tris-HCl 50mM, pH 7.9, glicerol 25% (v/v); Na<sub>2</sub> EDTA 0.1mM y DTT 0.2mM.
  - Acrilamida 30 % : acrilamida 30 %, bis-acrilamida 0.8% y glicerol 30 %.
- e) Tinción de Geles de Poliacrilamida
- Solución de Coomassie: azul brillante de Coomassie (R-250) 0.25%; metanol 45%.
  - Solución desteñidora I (Alto metanol): metanol 45%; ácido acético 7.5%.
  - Solución desteñidora II (Bajo metanol): metanol 5%; ácido acético 7.5%.
  - Solución A: se mezclan 21ml de NaOH 0.36% con 1.2ml de NH<sub>4</sub>OH concentrado.
  - Solución B: AgNO<sub>3</sub> 0.2%.
  - Solución reveladora: ácido cítrico 0.005% y formaldehído 0.0002%.
  - Solución fijadora: ácido acético 1%.
- f) Ensayos de Actividad
- Solución de lavado de papeles DE-81: pirofosfato de sodio (Na<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) 0.8%; fosfato disódico dodecahidratado (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O) 10%; dodecil sulfato de sodio 0.1%.
  - Líquido de centelleo: PPO 0.5%; POPOP 0.3% disueltos en tolueno.

### Extracción de plásmido

En ésta técnica las células de cultivos de 400 ml de *E. coli* M15[pDMI.1; pRT/CG] se cosecharon por centrifugación a 5000 rpm durante 15 minutos; se eliminó el medio con trampa de vacío procurando dejar la pastilla lo más seca posible. La pastilla se resuspendió en 4 ml de TS agitando con vibrador, se transfirió a tubos de polialómero y se le agregaron 4 ml de ELT agitando suavemente con vibrador. La mezcla anterior se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y 10 minutos a 70°C (en baño maría). Se centrifugó 20 minutos a 40,000 rpm en rotor 50ti a 4°C; se rescató el sobrenadante (sn), se colocó en tubos corex de 15 ml y se agregó un volumen de PEG 20 %, NaCl 1 M, mezclar cuidadosamente e incubar 30 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar 10 minutos a 3000 rpm, eliminar el sn y resuspender la pastilla en 2 ml de TE. Agregar 2 ml de cloruro de litio 5 M frío e incubar en hielo 5 minutos, se centrifugó 10 minutos a 3000 rpm a 4°C, se colocó en tubo corex de 30 ml y se le agregaron 10 ml de etanol absoluto a -20°C, mezclar. Centrifugar a 8,000rpm 15 minutos a 4°C; se decantó el sn y se lavó la pastilla con etanol 80 % dos veces, centrifugando a 8,000 rpm 5 minutos cada vez. Secar la pastilla al vacío, resuspenderla en 500 µl de TE y pasarla a tubos eppendorff; agregar RNAasa A a una concentración final de 40 µg/ml e incubar 15 minutos a 37°C. Agregar 0.5 ml de PEG 8,000 13 %, NaCl 1.6 M y mezclar por inversión.

Centrifugar 15 minutos a 12,000 rpm en tubos eppendorff a 4°C, se retira el suero y se resuspende la pastilla en 150 µl de TE con agitador por vibración. Agregar 150 µl de solución cloroformo:alcohol isoamílico (1:24) y agitar con vibrador, centrifugar 5 minutos a 12,000 rpm a temperatura ambiente; se toma la fase superior y se le agrega un volumen (~ 150 µl) de acetato de amonio 4 M. Agregar 2.5 volúmenes de etanol absoluto a -20°C y centrifugar 30 minutos en centrifuga eppendorff a 4°C. Lavar la pastilla con etanol al 80 % y secarla 5 a 10 minutos en desecador. La pastilla se resuspende finalmente en 100 µl de TE.

### Pureza y cuantificación de DNA

La pureza de una muestra de DNA se puede calcular mediante espectrofotometría, midiendo la proporción de absorbencia de luz ultravioleta de 260 nm con respecto a la absorbencia del mismo tipo de luz de 280 nm; si el DNA es puro la relación será:  $A_{260}/A_{280} = 1.8$ . Cuando la muestra de DNA cumple esta relación es posible cuantificarla midiendo la absorbencia a 260 nm y utilizando la siguiente ecuación:

$$\frac{A_{260} \times \text{dilución} \times \text{Factor de corrección (50)}}{1000} = X \mu\text{g}/\mu\text{l de DNA}$$

### Corte de DNA con enzimas de restricción

Para realizar cortes en sitios específicos del plásmido con enzimas de restricción se coloca en un tubo eppendorff 1 g de DNA, se agrega la solución amortiguadora de reacción diluida con agua desionizada; se agregan 5 a 10 unidades de enzima, se agita suavemente y se incuban a 37°C de 1 a 3 horas dependiendo de que enzima se utilice.

### Columna de DEAE- Sephacel

La columna se preparó suspendiendo el DEAE-Sephacel en 10 volúmenes de solución amortiguadora de elución, se dejó reposar y una vez precipitado se decantó la solución; éste tratamiento se aplicó tres veces sucesivas, después de lo cual se empaquetó un volumen de 4.5 ml de resina en una columna de 5 cm de largo y aproximadamente 8 mm de diámetro. Una vez montada se dejaron correr 50 ml de la misma solución a través de la columna antes de colocar la muestra. La columna, mangueras y conexiones se lavaron con agua bidestilada y se esterilizaron antes de usarse.

### Electroforesis en gel de Agarosa

Tanto el carro como la cámara de electroforesis se lavaron con agua bidestilada. Se cierra el carro por ambos lados con cinta adhesiva y se coloca el peine formador de pozos cuidando que quede un espacio de 0.5 a 1 mm de agarosa aproximadamente entre el fondo del diente y la base del gel de modo que los pocillos queden completamente sellados. Se prepara un gel al 1 % con 0.2 g de agarosa diluidos en 25 ml de TBE 1 X. Se calienta la solución a 50°C hasta que desaparezcan completamente los gránulos, se agrega bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 µg/ml y se vierte toda la solución en el carro, se deja enfriar. Una vez que polimeriza se agrega un poco de TBE y se saca el peine verticalmente con firmeza. Se vierten 100 ml de TBE en la cámara, se desprende la cinta adhesiva del carro y se sumerge éste con el gel en la cámara de modo que quede completamente cubierto por TBE. Una muestra de aproximadamente 300 ng de DNA, cortado con enzimas de restricción,

aforada a  $10\mu\text{l}$  con TE y mezclada con  $2\mu\text{l}$  de colorante se introduce en cada pocillo del gel con punta y pipeta de precisión. Inmediatamente se conectan los cables, se enciende la fuente de poder y se regula para correr la electroforesis a 70 V, la muestra migrará hacia el polo positivo (+). Cuando sale el primer colorante se baja el voltaje hasta 0 V y se desconecta la cámara. Se saca el gel con guantes, se coloca en el transiluminador y se observa con luz ultravioleta.

#### Preparación de bolsas de diálisis y dializado

Se usaron membranas de diálisis Spectrapore de hasta 12 kDa de exclusión de 1/2 pulgada; se cortaron en fragmentos de 10 cm, se colocaron en 500 ml de una solución de bicarbonato de sodio al 2% y EDTA 1 mM, se dejaron en ebullición 10 minutos. Se enjuagaron y se trataron a ebullición 10 minutos en agua bidestilada, después se colocaron en agua bidestilada estéril y se almacenaron a  $4^{\circ}\text{C}$ . Las pinzas para sellar las bolsas de diálisis se lavan con agua bidestilada y se esterilizan.

Para colocar la muestra a dializar dentro de la bolsa se sella un extremo con pinzas, se coloca la muestra con pipetas Pasteur estériles o con puntas y se sella el otro extremo; la bolsa con la muestra se coloca en un vaso de precipitado con un volumen de uno a dos litros de solución amortiguadora de diálisis, se deja en agitación con barra magnética toda la noche en cuarto frío ( $4^{\circ}\text{C}$ ). Todo el proceso se realiza utilizando pinzas, puntas, pipetas Pasteur y guantes estériles en el cuarto frío, al igual que al recuperar la muestra ya dializada.

#### Purificación Parcial de la RT del VIII-1

La purificación parcial de la enzima se realizó de acuerdo con el método de Le Grice (Le Grice *et al.*, 1987). Cultivos de 500ml de medio Luria, con ampicilina ( $100\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y Kanamicina ( $25\mu\text{g}/\text{ml}$ ), se inoculan con la bacteria anteriormente descrita y se incuban a  $37^{\circ}\text{C}$  en agitación hasta alcanzar 1/2 de la fase *log* (en este caso  $A_{600} = 0.7$ ), momento en el que se les agrega IPTG a una concentración final de  $400\text{ g}/\text{ml}$  y se incuban a  $37^{\circ}\text{C}$  durante cuatro horas para inducir la transcripción. Las bacterias se cosecharon por centrifugación a  $8,000\text{ rpm}$  5 min a  $20^{\circ}\text{C}$ . Esta pastilla se resuspende en amortiguador de lisis a razón de  $2.5\text{ml}$  por g de bacterias, se le agrega lisozima a una concentración final de  $1\text{mg}/\text{ml}$  y se incuba a  $0^{\circ}\text{C}$  durante 30 min. Se le agrega Tritón X-100 y NaCl a concentraciones finales de 0.1% y 1M respectivamente para completar la lisis. El lisado celular se centrifuga a  $40,000\text{ rpm}$  y  $4^{\circ}\text{C}$  por 30 min; se rescata el sobrenadante y se dializa durante toda una noche contra amortiguador de diálisis. A este dializado se le agregan 0.3 volúmenes de amortiguador para remoción de ácidos nucleicos, se incuba a  $0^{\circ}\text{C}$  15 min y se centrifuga a  $10,000\text{ rpm}$  durante 15 min; el DNA queda en la pastilla, se rescata el sobrenadante. La muestra libre de ácidos nucleicos se aplica a una columna de  $4.5\text{ml}$  de DEAE-Sephacel que se equilibra y desarrolla con el amortiguador correspondiente a una tasa de flujo de  $3\text{ml}/\text{hora}$ . Se colectan fracciones de  $350\mu\text{l}$  y se leen a  $280\text{nm}$  en el espectrofotómetro; las fracciones de flujo continuo que contienen proteína y presentan actividad enzimática de reverso transcriptasa se mezclan y se concentran por diálisis con amortiguador concentrador toda la noche. En la Figura 9 se muestra el diagrama de éste proceso.

### Purificación Parcial de la RT del VIH-1

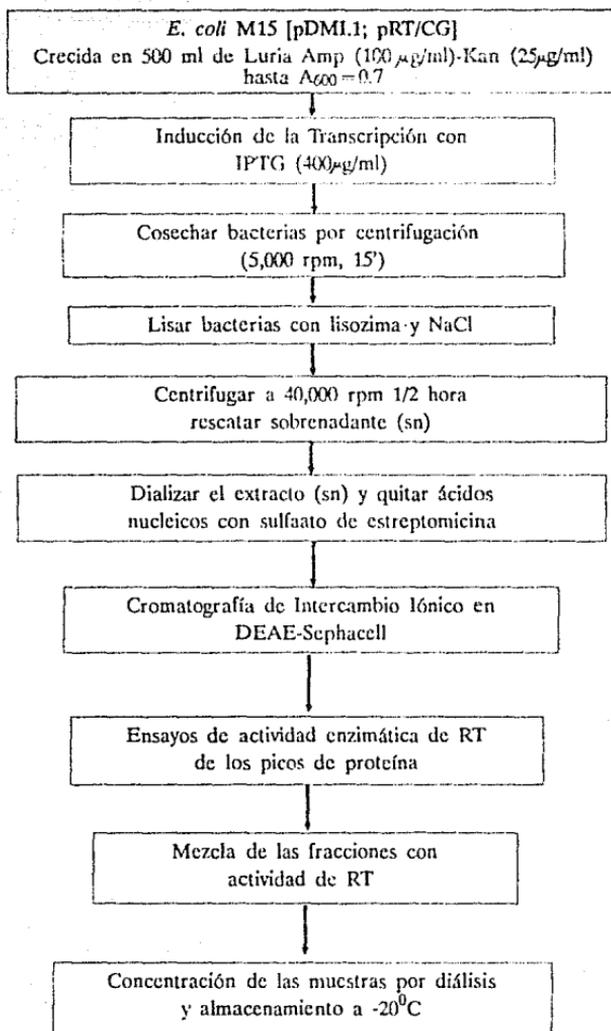


Figura 9. PROCESO DE PURIFICACION DE LA RT. Diagrama del proceso de purificación parcial de la reverse transcriptasa a partir de extractos de células inducidas de acuerdo con el método de Le Grice et al., 1987.

## Electroforesis en gel de poliacrilamida

El proceso de electroforesis de muestras de proteína en gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (presencia de dodecil sulfato de sodio o SDS) se realizó por el método de Laemmli (1970). En una cámara de electroforesis de Hoefer Scientific Instruments (HSI) se preparan los geles laminares de 16 cm<sup>2</sup> y 1.5 mm de espesor, a partir de una solución de acrilamida 30 % ; el gel separador se prepara al 12.5 % de acrilamida, 20 % RGB con 0.5 μl/ml de TEMED y 1 μg/ml de persulfato de amonio ambos al final para polimerizar la acrilamida. El gel concentrador donde se forman los carriles, se hizo al 13 % de acrilamida, 10.7 % SGB, TEMED 0.5 μl/ml y persulfato de amonio 5 μg/ml. Todo el proceso de preparación, manejo y tinción de geles se realiza con guantes. Los vidrios de la cámara entre los que se forma el gel deben estar totalmente secos y libres de polvo. Inmediatamente después de vertir la solución para el gel separador entre los vidrios se deposita cuidadosamente una capa de aproximadamente 600 μl de SDS 0.1 %, una vez que polimeriza y se forma el gel se tira el SDS, se lava la superficie del gel con agua bidestilada, se coloca el peine formador de carriles y se vierte el gel concentrador; cuando polimeriza éste último se retira el peine, se lavan los carriles con agua bidestilada, y se secan antes de colocar las muestras.

Se colocaron 100 μl de muestra o una dilución de la misma aforada a 100 μl con A25 en un tubo eppendorf y se le agregaron 30 μl de solución amortiguadora de muestra, ésta mezcla se coloca en baño maría a ebullición durante 3 minutos. Las muestras así tratadas se vierten en sus respectivos carriles con sumo cuidado, evitando contaminación entre ellos. La electroforesis se corrió con solución amortiguadora de corrida a 60 V durante 12 horas.

## Tinción de geles de poliacrilamida

### a) Tinción de Coomassie (Weber *et al.*, 1972)

En este proceso los geles se colocan en solución de Coomassie durante dos horas en agitación orbital continua (60 rpm), después se quita esta solución y se agrega solución desteñidora I de una a dos horas, se pasa a solución desteñidora II durante dos horas y finalmente a metanol 50 %, siempre en agitación, hasta obtener el contraste deseado entre el fondo y las bandas de proteína. Esta tinción se aplicó a los geles donde se corrieron muestras que contenían cantidades relativamente altas de proteína.

### b) Tinción con plata (Wray *et al.*, 1981)

Inicialmente se coloca el gel en metanol 50 % en agitación continua (60 rpm) de 2 a 20 horas, se le hacen dos lavados de 30 minutos en agitación con agua bidestilada y se deja en metanol 50 % dos horas más. La solución A se vierte en un matraz, en agitación (con barra magnética) y se se le agregan gota a gota y despacio 4 ml de solución B cuidando que no se precipite la plata; una vez hecho esto se afora la solución así formada a 100 ml con agua bidestilada. Se lava el gel con agua bidestilada y se le agrega la solución recién aforada con la que permanece en agitación (orbital) durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo se lava el gel con agua bidestilada 5 minutos y se le agrega solución reveladora preparada al momento, se deja en agitación hasta que aparezcan las bandas de proteína y cuando tienen la intensidad deseada se fija la tinción parando la reacción con ácido acético 1 %. Los geles se pueden desteñir con ácido nítrico 50 %. Esta tinción se utilizó para detectar cantidades muy pequeñas de proteína.

## Ensayos de actividad enzimática de las RT's

### a) Actividad enzimática de la RT del VIH-1

Para detectar la actividad de la RT durante la purificación se realizaron ensayos de reverso transcripción, es decir síntesis de polidesoxirribonucleótidos sobre un molde de polirribonucleótido. Como molde se utilizó poli(rC) 10 µg/ml; oligo(dG) 10.5 µg/ml, como cebador; dGTP 5 µM y [<sup>α-32</sup>P]dGTP 1 µCi, como sustrato; tris-HCl 50 mM pH 8.0, DTT 5 mM, tritón X-100 0.05 %; otros reactivos (MgCl<sub>2</sub>, NaCl, KCl) a diversas concentraciones, como se indica en las figuras; así como de 1 a 4 µl de muestra de RT parcialmente purificada, todo en un volumen final de 50 µl. Para los ensayos de replicación, síntesis de un polirribonucleótido sobre un molde de polirribonucleótido, se utilizaron los mismos reactivos cambiando el cofactor por Mn<sup>++</sup>, agregado como MnCl<sub>2</sub>, y el sustrato por GTP y [<sup>α-32</sup>P]GTP a las concentraciones usadas para el otro sustrato. El tiempo de incubación a 37°C inicialmente fue variable y posteriormente se fijó de acuerdo con los resultados obtenidos.

### b) Actividad enzimática de la AMV-RT

Estos ensayos se realizaron en un volumen final de 50 µl de mezcla compuesta por los siguientes reactivos: tris-HCl 50 mM pH 8.3, DTT 1 mM, KCl 40 mM, poli(rC) 10 µg/ml, oligo(dG) 5 µg/ml, dGTP 5 M y 1 µCi de [<sup>α-32</sup>P]dGTP (sustituyendo los dos últimos por GTP 5 µM y por 1 µCi de [<sup>α-32</sup>P]GTP, respectivamente en los ensayos de replicación); las concentraciones de MgCl<sub>2</sub> y de MnCl<sub>2</sub> fueron variables como se indica en las figuras, a ésta mezcla se le agregaron aproximadamente 2u de AMV-RT y se incubó 10 minutos a 37°C en todos los casos.

### c) Detección de la actividad enzimática

En todos los ensayos la reacción se paró con 4 µl de EDTA 0.5 M y la mezcla se virtió en filtros DE-81 dejando que se absorbiera completamente, a los filtros así impregnados se les aplicaron 3 lavados sucesivos de 5 minutos con solución de lavado y dos lavados instantáneos con etanol; se secaron a 37°C y se colocaron en viales de vidrio con 3 ml de líquido de centelleo. Los viales se pasaron a un contador de centelleo líquido, B-Mini Axi Beta 260 Tricarb 4000, para medirlos bajo un programa de detección de emisiones β por <sup>32</sup>P durante 1 minuto cada uno; para determinar el número de cuentas de fondo se utilizó en todos los experimentos un filtro sin muestra dentro de un vial con 3 ml de líquido de centelleo.

### d) Determinación de la incorporación de sustrato

Para calcular la equivalencia en pmol de las cuentas por minuto detectadas se utilizaron los siguientes datos y ecuaciones:

1 Ci = 3.7 X 10<sup>10</sup> desintegraciones por segundo (dps), luego

1 µCi = 3.7 X 10<sup>4</sup> dps, es decir

1 µCi = 2.22 X 10<sup>6</sup> cpm (a) y ésta es la radioactividad que se utiliza en cada ensayo.

En 50 µl de mezcla de reacción hay 250 pmol de sustrato (ya que la concentración final es 5 µM), así que 250 pmol = 2.22 X 10<sup>6</sup> cpm, de la ecuación (a), y entonces se tiene que 1 pmol = 8880 cpm.

# RESULTADOS

## I REVERSO TRANSCRIPTASA DEL VIH-1

### Extracción del plásmido

Antes de proceder a la purificación de la RT se realizaron extracciones de plásmido para confirmar su estructura mediante algunos cortes con enzimas de restricción por un lado, y por otro para disponer de plásmido para transformar bacterias. En la primera extracción se obtuvieron 150 $\mu$ l de solución de DNA de plásmido en TE a una concentración de 1.59 $\mu$ g/ $\mu$ l, en la segunda se obtuvo el mismo volumen pero con una concentración de 1.61 $\mu$ g/ $\mu$ l. Este DNA plasmídico se utilizó para hacer cortes con enzimas de restricción ensayando con *Eco*RI y *Xho*I, en la Figura 10 se aprecia el resultado de estos cortes en una electroforesis en gel de agarosa, el peso molecular de los fragmentos obtenidos corresponde al tamaño que se esperaba a partir del mapa de la Figura 7. Estos resultados confirmaron la estructura de pRT/CG por lo cual se procedió entonces a la purificación parcial de la RT.

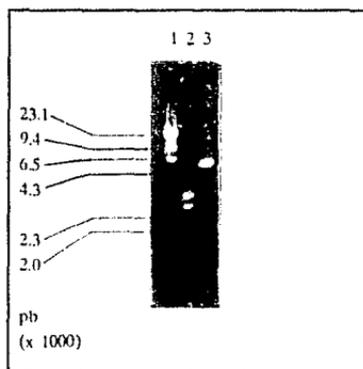


Figura 10. CORTE DEL PLASMIDO CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN. Carril 1, marcador de peso molecular (genoma del fago lambda cortado con *Hind* III; 2, pRT/CG cortado con *Eco*RI resultando dos fragmentos de aproximadamente 3.2 y 2.8 Kilobases; 3, pRT/CG cortado con *Xho*I produce el plásmido linealizado de aproximadamente 6 Kilobases.

### Purificación parcial de la RT del VIH-1

Se siguió el método de Le Grice y colaboradores (1987), partiendo siempre de cultivos de 500 ml de bacterias. Aunque se realizó en varias ocasiones sólo se muestran, para algunas fases, los resultados de una de las purificaciones. Debido a que la RT se obtuvo a partir de un vehículo de expresión (ver Materiales y Métodos) se aplicaron algunos de los pasos de purificación a cultivos bacterianos no inducidos con IPTG.

El proceso de purificación parcial se analizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (presencia de dodecil sulfato de sodio; SDS-PAGE, por sus siglas en inglés) como se muestra en la Figura 11, donde es clara la presencia de una banda muy intensa de proteína de 64 kDa solo en los carriles correspondientes a cultivos bacterianos inducidos, ésta banda es precisamente la RT del VIH-1 y está totalmente ausente de los carriles de cultivos no inducidos.

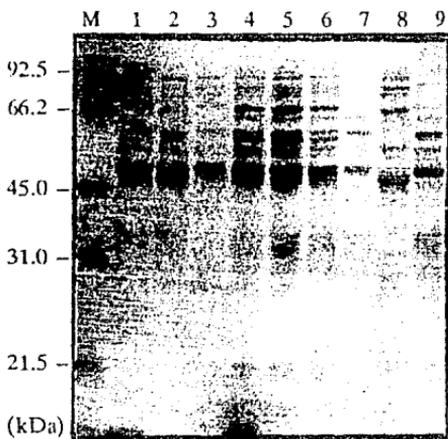


Figura 11. ANALISIS DEL PROCESO DE PURIFICACION POR SDS-PAGE. Electroforesis en gel de poliacrilamida de las muestras en los pasos de purificación; el gel se tiñó con Coomassie. Carril M, marcadores de peso molecular. Carriles 1 a 3 a partir de células no inducidas; carriles 4 a 9, a partir de células inducidas. 1, extracto celular; 2, extracto celular dializado; 3, extracto celular dializado y sin ácidos nucleicos; 4, extracto celular; 5, extracto celular dializado; 6, extracto celular dializado sin ácido nucleico; 7, fracción que eluye de la columna cromatográfica a 25 mM de NaCl; 8, fracción que eluye de la misma columna a 200 mM de NaCl y 9, fracciones del pico de 25 mM de NaCl mezcladas y concentradas.

Al analizar la cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephacell, se obtuvieron dos picos principales de proteína cuando se midió la absorbencia de las fracciones a 280 nm en el espectrofotómetro; de éstos sólo el primero, que eluye a 25 mM de NaCl, presentó actividad de RT (Figura 12).

Un análisis de la actividad enzimática, de reverso transcripción, de las fases de dicho proceso realizado tanto a partir de células inducidas como no inducidas aparece en la Tabla 6 y en la Figura 13. Es notable el aumento de actividad a través de la purificación para el primer caso, donde se alcanza un máximo en las fracciones que eluyen a 25 mM de NaCl de la columna de DEAE-Sephacell (intercambio iónico), en tanto que las fracciones eluidas a 200 mM de NaCl prácticamente no presentan actividad; por contraste cuando se usaron células no inducidas no se observó tal aumento de actividad, aún cuando parece existir una actividad basal extremadamente baja.

Debido a que se utilizó Tritón X-100 durante la purificación, no fue posible cuantificar la proteína obtenida ni calcular el número de unidades de actividad enzimática. La actividad

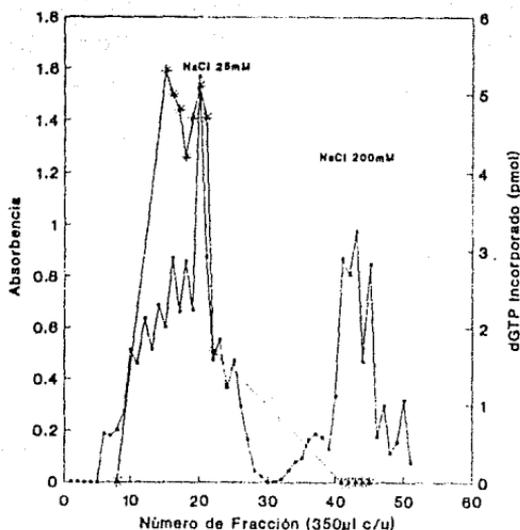


Figura 12. CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO. La columna de DEAE-Sephacel se desarrolló con solución amortiguadora de elución a 25 mM de NaCl y una vez que salió el primer pico se eluyó con la misma solución a 200 mM de NaCl, como se indica. Se midió la absorbancia de las fracciones a 280 nm (■) y la actividad de reverso transcriptasa de las mismas (\*). Para los ensayos de actividad se usaron 10 µl de cada fracción, MgCl<sub>2</sub> 10mM y KCl 120 mM.

Fase de purificación	Inducidas		No Inducidas	
	Detección (cpm)	dGTP Incorporado (pmol)	Detección (cpm)	dGTP Incorporado (pmol)
Extracto crudo	12,486	1.4	2,504	0.3
Extracto dializado	84,372	9.5	1,705	0.2
Extracto dial.s/uc. nucleicos	134,184	13.9	2,842	0.3
Fracción que eluye a 25 mM de NaCl	330,917	37.2	—	—
Fracción que eluye a 200 mM de NaCl	2,521	0.3	—	—

Tabla 6. Actividad de las muestras en las fases de purificación. Se muestran los resultados para extracción apartir de células inducidas y apartir de células no inducidas como se indica. El blanco registrado fué de 943 cpm.

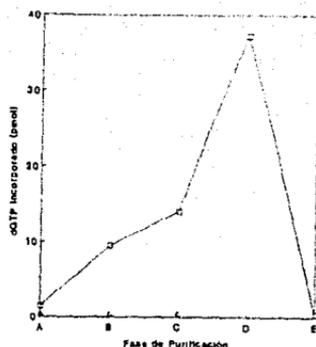


Figura 13. ACTIVIDAD DE RT EN LAS FASES DE PURIFICACION. Apartir del cultivo de células inducidas (□); a partir de cultivos de células no inducidas (◇). A, extracto crudo; B, extracto dializado; C, extracto dializado sin ácidos nucleicos; D, fracción de la columna que eluye a 25 mM de NaCl y E fracción que eluye a 200 mM de NaCl de la misma columna. Se usaron 5  $\mu$ l de muestra de cada fase, MgCl<sub>2</sub> 5 mM y 30 minutos de incubación en cada ensayo.

Muestra	Volumen final (l)	Detección (cpm)	dGTP Incorporado (pmol)
E1	350	224,577	25.29
E2a	250	96,724	10.95
E2b	180	132,501	14.92
E2c	450	134,243	15.12
E2d	230	60,572	5.96
E3a	165	198,174	22.22
E3b	300	99,467	11.20

Tabla 7. Actividad de las muestras obtenidas en tres extracciones. El número de las muestras se refiere a la extracción y la letra minúscula a la muestra particular. El ensayo se realizó utilizando las condiciones óptimas para actividad de RT y 4  $\mu$ l de muestra en cada caso.

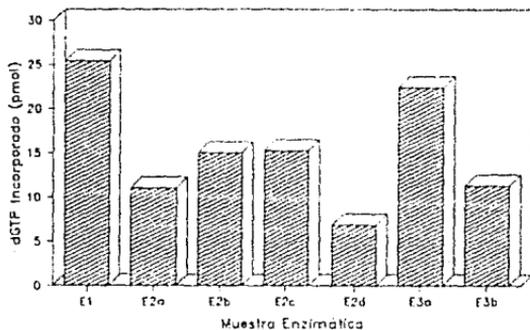


Figura 14. ACTIVIDAD DE RT DE LAS MUESTRAS OBTENIDAS EN 3 EXTRACCIONES. El ensayo se hizo en condiciones óptimas para actividad de RT como se describe en la Tabla 7. Los letreros son igual que en la Tabla 7.

## Condiciones óptimas de actividad enzimática de la RT

### a) Tiempo y concentración de enzima

Las condiciones óptimas de ensayo de la RT reportadas hasta ahora son variables (Le Grice *et al.*, 1987; Leuthardt y Le Grice, 1988; Cheng *et al.*, 1987; Larder *et al.*, 1987), por lo que se decidió determinar las condiciones óptimas a usarse durante éstos ensayos. Inicialmente se realizaron ensayos de cinética enzimática para determinar el tiempo de incubación más adecuado, como se indica en la Tabla 8 y en la Figura 15 resultó ser de 30 minutos, tiempo de incubación que se usó en los ensayos subsiguientes. Se encontró que la RT es incapaz de polimerizar nucleótidos en ausencia de molde (Tabla 9), a diferencia de lo que ocurre con otras polimerasas (Chambrlin, 1982). El resultado de ensayos a diversas concentraciones de enzima aparece en la Tabla 10 y en la Figura 16.

### b) Concentración óptima de $MgCl_2$ , NaCl y KCl

La determinación de la concentración óptima de  $[Mg^{++}]$  se realizó en presencia de NaCl ya que ésta sal ha sido utilizada a diversas concentraciones por el mismo conjunto de autores (Le Grice *et al.*, 1987; Leuthardt y Le Grice, 1988). Si bien no se hizo una curva completa de NaCl, se usaron las concentraciones reportadas que son 2 mM y 50 mM respectivamente, y como se ve en la Figura 17 y en la Tabla 11, el mejor resultado se obtuvo a 2 mM de NaCl en combinación con 5 mM de  $MgCl_2$  que fué el óptimo para éste cofactor de la polimerasa. Habiendo encontrado las concentraciones óptimas de los reactivos anteriores se procedió a realizar ensayos a diversas concentraciones de KCl, ya que se ha visto que es necesario para la actividad de otras RT's (Maniatis *et al.*, 1982; Larder *et al.*, 1987); sin embargo, como muestran la Figura 18 y la Tabla 12, se encontró que la mejor actividad se obtiene en ausencia total de KCl, por lo cual éste compuesto no se utilizó en ensayos posteriores. Finalmente, se realizó un ensayo de cinética enzimática bajo las condiciones óptimas (Tabla 13 y Figura 19) que serviría como punto de comparación para ensayos posteriores. Las condiciones óptimas de actividad enzimática de la RT se muestran en la Tabla 14.

t de incubación a 37°C (minutos)	E1		E2	
	Detección (cpm)	dGTP Incorporado (pmol)	Detección (cpm)	dGTP Incorporado (pmol)
0	0	0	0	0
5	2,980	3.3	2,303	2.6
10	4,631	5.2	4,238	4.8
15	6,045	6.8	5,306	6.0
30	9,045	10.2	7,737	8.7
60	8,679	9.8	6,926	7.8

Tabla 8. Cinética Enzimática. Actividad de reverso transcriptasa durante un experimento de cinética; a diferencia del resto de los experimentos aquí se utilizó una concentración de 50  $\mu$ M de sustrato, por lo que 1 pmol=880 cpm. El blanco fué de 199 cpm.

Enzima	Molde	t de incubación (min)	Detección (cpm)	dGTP Incorporada (pmol)
+	+	0	0	0
+	+	30	224,577	25.29
+	-	30	1,072	0.12
-	+	30	761	0.08

Tabla 9. Actividad de RT en ausencia de molde. El ensayo se realizó utilizando 4  $\mu$ l de E1 para cada tubo y en condiciones óptimas para actividad de RT.

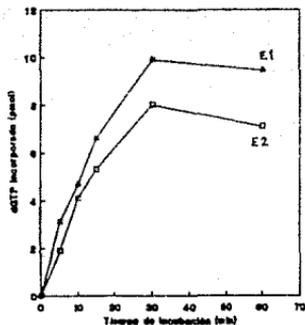


Figura 15. CINETICA ENZIMATICA DE ACTIVIDAD DE RT. Se usaron 4  $\mu$ l de muestra concentrada de la primera extracción y 2  $\mu$ l de la segunda extracción, las concentraciones de  $MgCl_2$  y de KCl fueron 10 mM y 120 mM respectivamente en el ensayo

Cantidad de muestra ( $\mu$ l)	E 1		E 2b		E 3b	
	Detección (cpm.)	dGTP Incorporado (pmol)	Detección (cpm.)	dGTP Incorporado (pmol)	Detección (cpm.)	dGTP Incorporado (pmol)
0	0	0	0	0	0	0
0.5	127,788	14.0	119,620	13.2	17,595	1.6
1.0	168,513	18.5	126,085	14.0	39,977	4.2
1.5	182,598	20.2	134,068	14.8	32,711	3.4
2.0	193,533	21.4	129,719	14.3	67,601	7.3
2.5	212,447	23.5	126,646	13.9	75,203	8.2

Tabla 10. Actividad de RT a diversas concentraciones de enzimas. En el ensayo se utilizó una muestra de cada extracción. El blanco fué de 3,356 cpm.

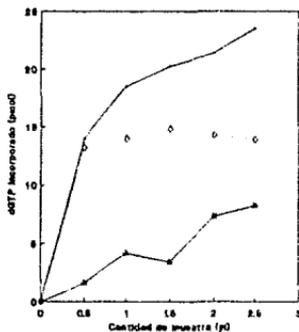


Figura 16. ACTIVIDAD DE RT A DIVERSAS CONCENTRACIONES DE ENZIMA. Muestra de enzima E1 ( $\blacktriangle$ ), E2b ( $\circ$ ) y E3b ( $\ast$ ). En el ensayo se utilizaron condiciones óptimas.

Concentración de MgCl <sub>2</sub> (mM)	NaCl 2 mM		NaCl 50 mM	
	Detección (cpm)	dGTP Incorporado (pmol)	Detección (cpm)	dGTP Incorporado (pmol)
0	990	0	367	0
1	1,031	0	623	0
2	1,017	0	9,923	1
3	6,636	0.6	21,072	2.3
5	60,534	6.7	23,543	2.6
8	42,566	4.7	26,406	2.9
10	22,797	2.4	29,259	3.2
12	17,275	1.8	41,944	4.6
15	15,430	1.6	50,196	5.6

Tabla 11. Concentración óptima de MgCl<sub>2</sub> y NaCl. Actividad enzimática de RT a diversas concentraciones de cloruro de magnesio, utilizando solo dos concentraciones diferentes de NaCl. El blanco, como se ve, fue de 990 cpm y de 367 cpm respectivamente.

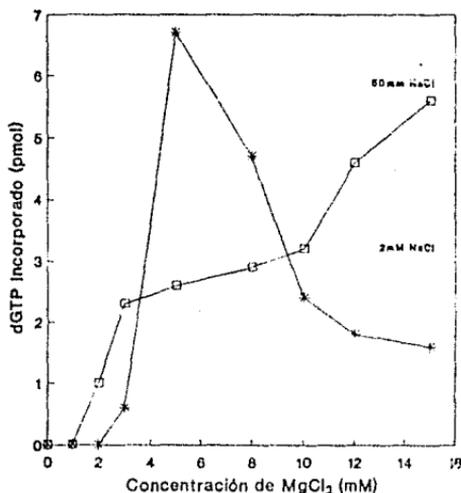


Figura 17. CONCENTRACION OPTIMA DE MgCl<sub>2</sub> Para encontrar la concentración óptima de MgCl<sub>2</sub> se hicieron ensayos en presencia de NaCl 50 mM (□) o en presencia de NaCl 2mM (\*). Se usaron 2 μl de enzima en cada ensayo y KCl 120 mM.

Concentración de KCl (mM)	Detección (cpm)	dGTP Incorporado (pmol)
0	89,174	10
10	54,078	6.1
20	59,664	6.7
50	50,213	5.6
80	45,303	5.1
100	30,676	3.4
120	40,863	4.6
140	33,706	3.8
160	25,382	2.8
180	13,010	1.4
200	10,266	1.1

Tabla 12. Concentración óptima de KCl. Actividad de verso transcriptasa a diversas concentraciones de KCl.

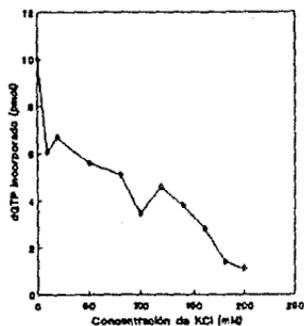


Figura 18. CONCENTRACION OPTIMA DE KCl. En estos ensayos se utilizó una concentración de  $MgCl_2$  5mM y de NaCl 2mM de acuerdo con los resultados obtenidos previamente; así como 30 min. de incubación a  $37^\circ C$ .

t de incubación a $37^\circ C$ (min)	Detección (cpm)	dGTP Incorporado (pmol)
0	0	0
5	39,979	4.5
10	86,767	9.8
15	123,878	13.9
30	145,314	16.4

Tabla 13. Cinética enzimática en condiciones óptimas. Actividad de reverso transcriptasa en un ensayo de cinética enzimática realizado utilizando las condiciones óptimas encontradas para esta actividad.

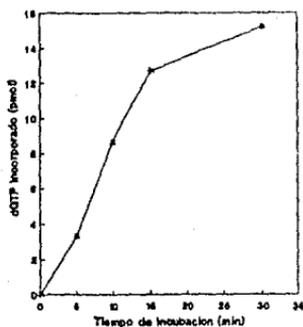


Figura 19. CINÉTICA EN CONDICIONES OPTIMAS. Se utilizaron las condiciones óptimas para actividad de RT (Tabla 14), así como  $1 \mu l$  de E1.

MgCl <sub>2</sub>	5 mM
KCl	0 mM
NaCl	2 mM
pH	8.0

Tabla 14. Condiciones óptimas para actividad de RT. Se enlistan las condiciones óptimas para la actividad de reverso transcriptasa de la RT del VIH-1 determinadas a lo largo de este trabajo.

### Caracterización de su actividad de replicasa

La recuperación de actividad de replicasa se consiguió provocando pérdida de especificidad en la RT mediante la sustitución de cofactor natural Mg<sup>++</sup> por Mn<sup>++</sup>, de modo que la enzima fué capaz de utilizar ribonucleótidos en lugar de desoxirribonucleótidos como sustratos.

Se encontró que la RT es capaz de incorporar ribonucleótidos aún en presencia de su cofactor natural Mg<sup>++</sup>; no obstante, en presencia de Mn<sup>++</sup> la incorporación de dichos sustratos fué mucho mayor como se aprecia en la Tabla 15 y en la Figura 20. En otro experimento realizado con una muestra enzimática de alta actividad se encontró una actividad de replicasa mucho mayor; así, el máximo de actividad de replicasa que es 7.5 pmol de GTP incorporado (Tabla 16, Figura 21), corresponde a aproximadamente el 45 % del máximo obtenido en actividad de RT que fué 15.2 pmol de dGTP incorporado (Tabla 13 y Figura 19) con la misma muestra enzimática (1 $\mu$ l de E1). Las condiciones para actividad de replicasa de la RT del VIH-1 aparecen en la Tabla 17; en la Tabla 18 se comparan las condiciones para actividad de transcripción inversa y de replicasa para esta enzima. La alta actividad de replicasa obtenida con muestras de RT parcialmente purificada condujo a la realización de experimentos similares con una RT pura, homogénea. Para conseguir éste propósito se utilizó la AMV-RT adquirida en SIGMA; los resultados de experimentos con ésta enzima se describen a continuación.

Concentración de Cofactor (mM)	Mn <sup>++</sup>		Mg <sup>++</sup>	
	Detección (cpm)	GTP Incorporado	Detección (cpm)	GTP Incorporado (pmol)
0	0	0	0	0
1	11,270	0.9	0	0
3	15,855	1.4	1,490	0
5	21,011	2	1,551	0
8	15,653	1.4	2,541	0.1
10	10,238	0.8	1,769	0.04
12	9,468	0.7	1,724	0.03

Tabla 15. Actividad de replicasa en presencia de manganeso y en presencia de magnesio. Actividad enzimática de replicasa tanto en presencia de manganeso como en presencia de magnesio. La actividad más alta de replicasa se da en presencia de manganeso. Se utilizó una muestra de RT del VIH-1 de baja actividad.

Concentración de Mn <sup>++</sup> (mM)	Detección (cpm)	GTP Incorporado (pmol)
0	0	0
1	40,244	4.3
2	60,129	6.6
5	61,170	6.7
8	67,820	7.5
10	55,315	6
12	44,421	4.8
15	27,672	2.9

Tabla 16. Actividad óptima de replicasa. Actividad de replicasa más alta encontrada con una muestra de alta actividad enzimática (E1).

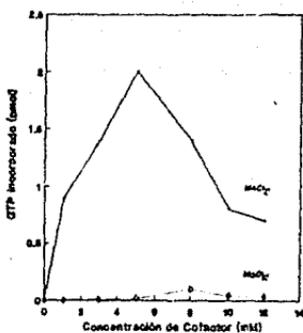


Figura 20. ACTIVIDAD DE REPLICASA DE LA RT DEL VIH-1 EN PRESENCIA DE  $MgCl_2$  Y DE  $MnCl_2$ . Para estos ensayos se utilizó GTP como sustrato y  $MnCl_2$  (\*) ó  $MgCl_2$  (o) como cofactor a diversas concentraciones como se indica. Se usó  $1 \mu l$  de enzima de la segunda extracción (baja actividad), 30 minutos de incubación y sin KCl. Se aprecia actividad de RNA polimerasa RNA dependiente más alta en presencia de  $MnCl_2$ .

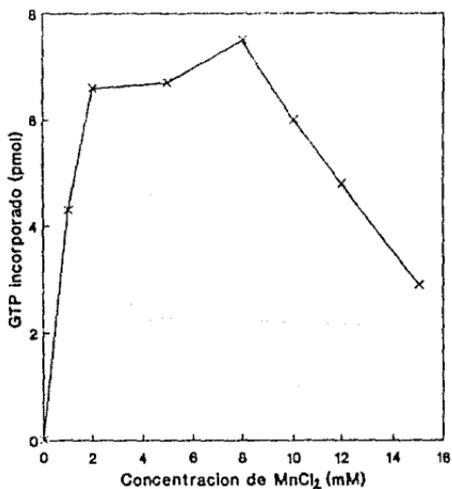


Figura 21. ACTIVIDAD ÓPTIMA DE REPLICASA. Se usó  $1 \mu l$  de enzima (E1), 30 minutos de incubación y sin KCl, es decir condiciones óptimas para actividad de replicasa.

MnCl <sub>2</sub>	5 mM
KCl	0 mM
NaCl	2 mM
pH	8.0

Tabla 17. Condiciones óptimas para actividad de replicas de la RT del VIH-1. Condiciones de ensayo para actividad enzimática con las que se encontró la actividad de replicasa más alta.

	Reverso Transcriptasa	RNA Replicasa
pH	8.0	8.0
MgCl <sub>2</sub>	5 mM	—
MnCl <sub>2</sub>	—	5 mM
NaCl	2 mM	2 mM
KCl	0 mM	0 mM

Tabla 18. Comparación de las condiciones óptimas de ensayo para actividad transcriptasa y de replicasa de la RT del VIH-1. En realidad sólo difieren en que para un caso se utilizó magnesio y para el otro manganeso como cofactor.

## II REVERSO TRANSCRIPTASA DEL AMV

### Caracterización de su actividad de replicasa

Todos los ensayos con AMV-RT se realizaron utilizando las concentraciones recomendadas por el proveedor (ver Materiales y Métodos), excepto para el MgCl<sub>2</sub>. Se analizó su actividad de reverso transcriptasa tanto en presencia de Mg<sup>++</sup> como de Mn<sup>++</sup>; en presencia de éste último cofactor es capaz de incorporar desoxirribonucleótidos a una tasa muy baja como muestran la Tabla 19 y la Figura 22.

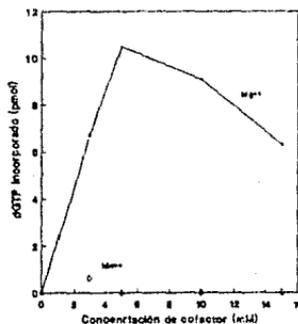


Figura 22. ACTIVIDAD DE REVERSO TRANSCRIPCIÓN DE LA AMV-RT EN PRESENCIA DE MgCl<sub>2</sub> Y DE MnCl<sub>2</sub>. En estos ensayos se usaron las condiciones recomendadas por el proveedor (ver materiales y métodos) excepto cofactor: Mg<sup>++</sup> para el primer caso (a) y Mn<sup>++</sup> para el segundo (o).

Concentración de cofactor (mM)	Mg <sup>++</sup>		Mn <sup>++</sup>	
	Detección (cpm)	dGTP Incorporado (pmol)	Detección (cpm)	dGTP Incorporado (pmol)
0	0	0	0	0.0
3	62,701	6.7	8,264	0.6
5	96,105	10.5	0	0.0
10	84,269	9.1	0	0.0
15	59,017	6.3	0	0.0

Tabla 19. Actividad de reverso transcriptasa de la RT del AMV tanto en presencia de manganeso como de magnesio; en ambos casos hay actividad, pero en presencia de Mn<sup>++</sup> es muy baja.

Concentración de Cofactor (mM)	Mn <sup>++</sup>		Mg <sup>++</sup>	
	Detección (cpm)	GTP Incorporado (pmol)	Detección (cpm)	GTP Incorporado (pmol)
0	0	0.0	0	0.0
1	39,141	3.9	7,495	0.7
2	12,603	0.9	9,572	0.9
3	7,256	0.3	9,111	0.9
5	5,489	0.1	9,482	0.9
8	5,556	0.1	9,428	0.9
10	10,752	0.7	6,809	0.6
12	5,256	0.4	8,200	0.8
15	7,671	0.1	7,034	0.6

Tabla 20. Actividad de replicasa de la RT del AMV. Esta reverso transcriptasa incorpora ribonucleótidos tanto en presencia de manganeso como en presencia de magnesio, aunque en éste último caso lo hace en un porcentaje muy bajo pero significativo.

Posteriormente se hicieron ensayos para analizar su actividad de replicasa en presencia de los dos cofactores anteriormente citados; las curvas de actividad se muestran en la Figura 23, donde es claro que puede incorporar ribonucleótidos en presencia de cualquiera de los cofactores, aunque lo hace con mayor eficiencia en presencia de Mn<sup>++</sup> (Tabla 20).

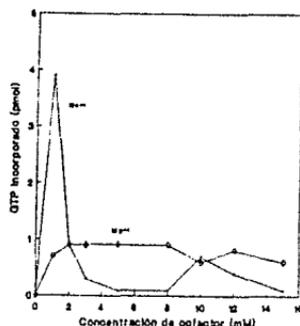


Figura 23. ACTIVIDAD DE REPLICASA DE LA AMV-RT. El ensayo se realizó tanto en presencia de Mn<sup>++</sup> (s) como en presencia de Mg<sup>++</sup> (o), utilizando 10 minutos de incubación a 37°C y GTP como sustrato en sustitución de dGTP.

Concentración de $Mn^{++}$ (mM)	Detección (cpm)	dGTP Incorporado (pmol)
0	64,110	7.0
1	30,921	3.3
2	7,676	0.7
3	3,914	0.3
4	3,700	0.2
5	4,220	0.3
10	5,165	0.4

Tabla 21. Efecto del manganeso sobre la actividad de reverso transcriptasa de la RT del AMV. Se mantuvo una concentración óptima de magnesio para actividad de reverso transcriptasa en todo el ensayo; además se agregó manganeso a las concentraciones indicadas. Es notable que a 1 mM de manganeso hay ya una inhibición del 50% de la actividad de reverso transcriptasa.

Concentración de $Mg^{++}$ (mM)	Detección (cpm)	dGTP Incorporado (pmol)
0	17,912	2.0
1	26,150	2.9
2	27,459	3.0
3	19,567	2.2
4	20,673	2.3
5	19,644	2.2
10	16,085	1.8

Tabla 22. Efecto del magnesio sobre la actividad de replicasa de la RT del AMV. Se mantuvo la concentración óptima de manganeso para la actividad de replicasa en todo el ensayo; además se agregó magnesio a las concentraciones indicadas. La presencia de magnesio eleva la actividad de replicasa, es decir, actúa cooperativamente con el manganeso para esta actividad.

Se midió también el efecto de la interacción de ambos cofactores con la enzima, aplicando  $Mn^{++}$  a diversas concentraciones y manteniendo la concentración óptima de  $Mg^{++}$ , para actividad de reverso transcriptasa; para actividad de replicasa se mantuvo constante la concentración óptima de  $Mn^{++}$  y se varió la concentración de  $Mg^{++}$  en el mismo ensayo. Los resultados aparecen en las Tablas 21 y 22, así como en las Figuras 24 y 25. El  $Mn^{++}$  juega un papel inhibitorio para la actividad de reverso transcriptasa, mientras que el  $Mg^{++}$  actúa cooperativamente con el  $Mn^{++}$  en el intervalo de 1 a 5 mM, elevando la actividad de replicasa. En la Figura 26 se muestra una comparación de las curvas de actividad de transcripción inversa con la de actividad de replicasa; la actividad de replicasa en este caso corresponde al 30% de la actividad de RT de la enzima (Tabla 23). Las condiciones para las dos actividades enzimáticas de la AMV-RT aparecen en la Tabla 24.

Concentración de cofactor (mM)	Actividad de RT		Actividad de Replicasa	
	Detección (cpm)	dGTP incorporado (pmol)	Detección (cpm)	dGTP Incorporado (pmol)
0	0	0	0	0
1	71,690	7.7	39,111	3.9
2	82,456	8.9	12,603	0.9
3	56,733	6.0	7,256	0.3
5	64,738	6.0	5,489	0.1
8	54,976	5.8	5,556	0.1
10	53,624	5.7	10,752	0.7
12	47,731	5.1	5,256	0.1
15	41,407	4.4	7,671	0.4

Tabla 23. Actividad de reverso transcriptasa vs actividad de replicasa de la RT del AMV. En cada ensayo se usó el cofactor y el sustrato correspondiente para cada actividad, es decir: magnesio y dGTP para la actividad de reverso transcriptasa; manganeso y GTP para actividad de replicasa.

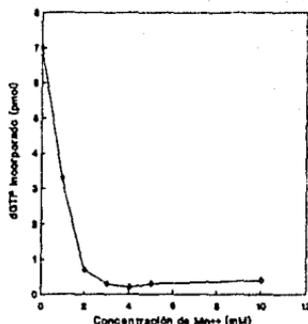


Figura 24. EFECTO DEL  $Mn^{++}$  SOBRE LA ACTIVIDAD DE REVERSO TRANSCRIPTASA DE LA AMV-RT. El ensayo se realizó utilizando la concentración óptima de  $Mg^{++}$  encontrada previamente (5mM) en todos los tubos y variando la concentración de  $Mn^{++}$  como se indica. Se usó una incubación de 10 minutos a  $37^{\circ}C$ .

	Reverso transcriptasa	RNA replicasa
pH	8.3	8.3
MgCl <sub>2</sub>	2 a 5 mM	—
MnCl <sub>2</sub>	—	1 mM
KCl	40 mM	40 mM

Tabla 24. Comparación de las condiciones óptimas de ensayo para actividad enzimática de reverso transcriptasa y de replicasa de la RT del AMV.

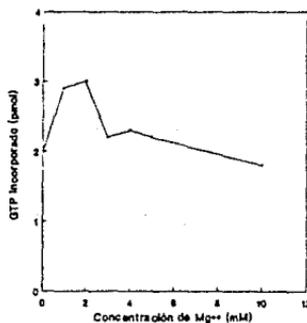


Figura 25.EFECTO DEL  $Mg^{++}$  SOBRE LA ACTIVIDAD DE REPLICASA DE LA AM-RT. el ensayo se realizó a la concentración óptima de  $Mn^{++}$  previamente encontrada (1 mM)) para actividad de replicasa y variando la concentración de  $Mg^{++}$  como se indica. Los tubos se incubaron 10 minutos a  $37^{\circ}C$ .

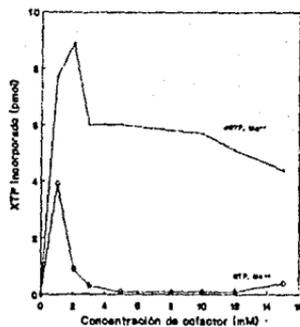


Figura 26. ACTIVIDAD DE RT VS ACTIVIDAD DE REPLICASA DE LA AMV-RT. Se usaron las mismas condiciones para ambos ensayos (ver Materiales y Métodos) excepto el cofactor ( $Mg^{++}$  ó  $Mn^{++}$ ) y el sustrato (GTP ó dGTP) como se indica en cada caso.

## DISCUSION

### LA ACTIVIDAD DE REVERSO TRANSCRIPTASA

La actividad de transcripción inversa recuperada de los extractos celulares mediante la purificación parcial se deben a la RT codificada en el plásmido y no a la presencia de una posible RT celular bacteriana. Se ha demostrado (Yee *et al.*, 1984) que la cepa de *E. coli* K-12 de donde proviene p[DML1] carece completamente de RT's celulares mediante ensayos de actividad de RT y a través de la búsqueda de moléculas similares al msDNA (DNA producido por una RT celular). De hecho, el marco de lectura abierta correspondiente a una RT se ha encontrado solamente en la cepa clónica de *E. coli* B (Lampson *et al.*, 1989).

Debido a que hasta ahora no se ha reportado la existencia de replicasas celulares en bacterias, es seguro que la actividad de replicasa encontrada en el producto de la purificación parcial se debe a la RT del VIH-1 codificada en el plásmido pRT/CG y no a la presencia de una replicasa celular.

Por otro lado, aunque no existe un método diagnóstico para identificar a la RT (Verma, 1977), se ha desarrollado un ensayo donde se utiliza poli(rC) como molde y oligo(dG) como cebador (Gerard *et al.*, 1976; Kiessling y Goulian 1976), que es específico para muchas RT's pero no para otras polimerasas. Debido a que las DNA polimerasas DNA-dependientes son incapaces de transcribir el complejo poli(rC)-oligo(dG) (Gerard *et al.*, 1976), este se ha utilizado para identificar la actividad de RT, y para analizar el efecto del  $Mn^{++}$  sobre la especificidad de sustrato de las dos enzimas estudiadas.

Las condiciones óptimas de ensayo encontradas para la RT del VIH-1 parcialmente purificada difieren de las reportadas previamente (Le Grice *et al.*, 1987; Leuthardt y Le Grice, 1988; Cheng *et al.*, 1987; Larder *et al.*, 1987) como se muestra en la Tabla 14. Esto se debe posiblemente a que en la muestra parcialmente purificada que se utilizó se encuentran presentes varios polipéptidos más de *E. coli*.

### EL MANGANESO Y LA INDUCCION DE ACTIVIDAD DE REPLICASA

Como se mencionó anteriormente el manganeso es capaz de inducir pérdida de especificidad en las polimerasas (Loeb y Mildvan, 1981), en este caso la incorporación de ribonucleótidos se debe a la presencia de dicho cofactor ya que los experimentos con ambas enzimas se realizaron utilizando las mismas condiciones para actividad de reverso transcriptasa que para actividad de replicasa, excepto el  $Mn^{++}$  (ver Resultados, Tablas 18 y 24).

Se ha propuesto la existencia de varios mecanismos posibles mediante los que el manganeso puede inducir pérdida en la fidelidad de incorporación en polimerasas (Loeb y Zakour, 1980): 1) la alteración en la conformación del sustrato por la sustitución en el sitio de unión al sustrato; 2) la alteración en la conformación de la enzima debido a la unión del metal en lugares diferentes al sitio activo catalítico (Slater *et al.*, 1972), y 3) especificidad alterada de la complementariedad de las bases del molde debido a la interacción del  $Mn^{++}$  con dicho molde. Es posible que en la pérdida de especificidad reportada en este trabajo, que permite a las RT's incorporar ribonucleótidos (y a otras polimerasas usar moldes inespecíficos), estén involucrados mecanismos similares al 1) y 2); en particular, si el mecanismo

responsable del cambio de especificidad es el 2) esto implica que bastan unos pequeños cambios conformacionales, inducidos por la unión del manganeso (Figura 27), para cambiar de molde y de sustrato.

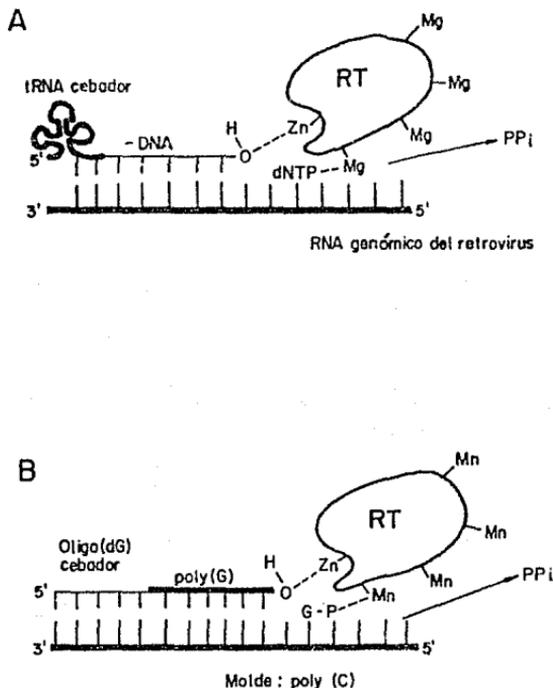


Figura 27. PAPEL DE LOS CATIONES METÁLICOS. (A) Actividad de transcripción inversa de las RT's virales estudiadas en la que requieren magnesio como cofactor. (B) Actividad de replicación in vitro inducida por la presencia de manganeso (modificado de Mildvan y Loeb, 1979).

Ello sugiere que en la evolución y diversificación de las polimeras los cambios conformacionales han sido de suma importancia en la adaptación a nuevas combinaciones molde-sustrato; dichos cambios no han sido demasiado drásticos, pues los resultados de este trabajo muestran que se pueden inducir fácilmente. Los cambios conformacionales que produjeron nuevas polimeras pudieron haberse generado mediante pocas mutaciones puntuales (Lazcano *et al.*, 1989), o bien con la adición de algunos aminoácidos más a la proteína en cuestión.

## LA ACTIVIDAD DE REPLICASA Y EL ORIGEN DE LAS RT's

Las RT's del VIH-1 y del AMV presentaron una actividad de replicasa del 45% y del 30%, respectivamente, de su actividad natural de transcripción inversa. Esta actividad de la RT puede interpretarse como una actividad vestigial, un remanente de la que presentaban las proteínas que le dieron origen. La RNA polimerasa de *E. coli* también presenta actividad de replicasa en presencia de manganeso (Biebricher y Orgel, 1973; Llaca *et al.*, 1987). Sin embargo, la actividad de replicasa de las RT's es mucho más alta, lo cual sugiere dos posibilidades: 1) la RNA polimerasa es demasiado compleja y muchas de las subunidades interfieren, abatiendo la actividad de la subunidad  $\beta'$  (propuesta como la catalítica y la más antigua por Lazcano, 1986), o bien 2) la RT es más cercana evolutivamente a la replicasa ancestral y por esto presenta una actividad vestigial mucho más alta.

De cualquier modo, el hecho de que las RT's actúen como replicasas es una evidencia de que este tipo de enzimas le dieron origen, pues como ya vimos, es posible que a la replicasa ancestral se le agregaran algunos aminoácidos y se sustituyeran otros, provocando cambios conformacionales en la enzima que permitieron utilizar sustratos diferentes. Posiblemente el efecto del manganeso en estos experimentos sea precisamente el de revertir estos cambios conformacionales, permitiendo la incorporación de ribonucleótidos nuevamente, como lo hizo la replicasa ancestral.

Las RT's suelen estar formadas por un solo polipéptido; algunas están constituidas por dos, en cuyo caso son homólogos y uno es producto del procesamiento del otro (Verma, 1977; Varmus y Swanstrom, 1982); este hecho y su capacidad de sintetizar un polirribonucleótido sobre un molde de RNA la convierte en un excelente modelo experimental de una de las enzimas más importantes y antiguas que pudo haber surgido en cuanto se estableció un sistema primitivo de síntesis de proteínas. A estas dos propiedades hay que agregar el hecho de que las RT's son las polimerasas que tienen la tasa de error más alta, sugiriendo que en su origen los mecanismos que contribuyen a la fidelidad de las polimerasas aún no estaban presentes, situando así su origen en la etapa evolutiva de transición, de genomas de RNA a genomas de DNA, arriba mencionada.

La presencia de actividad de replicasa tanto de la RNA polimerasa (Llaca *et al.*, 1987) como de la RT's es también un indicio de del origen común de estas enzimas. Pero si ambas surgieron a partir de una replicasa ancestral es necesario explicar como aparecen nuevas subunidades en las polimerasas, y por qué son seleccionadas a favor. Si nos referimos solamente al mecanismo de aparición podemos pensar en la amplificación génica y asociación de los polipéptidos resultantes, ya que las subunidades de una reverso transcriptasa con frecuencia presentan alto porcentaje de similitud entre sí (Varmus y Swanstrom, 1982). En cuanto a las razones que provocaron la permanencia de estas proteínas multiméricas, es posible que hayan conferido mayor estabilidad a los complejos enzima-molde; así, por ejemplo, las dos subunidades de las RT's de los retrovirus del grupo de sarcoma-leukosis de aves tienen funciones distintas: la  $\alpha$  tiene actividad catalítica y la  $\beta$  no. Sin embargo el complejo  $\beta$  tiene mayor estabilidad térmica en presencia de molde que la subunidad por sí misma unida al molde (Verma, 1977; Varmus y Swanstrom, 1982). Otra posibilidad es que las subunidades adicionales en estas y otras polimerasas sirvieran para el reconocimiento de cierto tipo de señales (como promotores,

terminadores, sitios de origen de replicación, entre otros) cuando aparece la puntuación y la regulación génica en las células.

### LA ACTIVIDAD DE REPLICASA Y LA TRANSICION RNA-DNA

En condiciones óptimas para actividad de reverso transcriptasa (que incluyen naturalmente la presencia de magnesio) las RT's utilizadas presentaron actividad de replicasa aunque en una proporción muy baja; es decir, en condiciones naturales son capaces de incorporar ribonucleótidos; además en presencia de manganeso incorporan también desoxirribonucleótidos.

Estos hallazgos permiten predecir que en condiciones naturales las RT's son capaces de incorporar tanto desoxirribonucleótidos como ribonucleótidos (estos últimos con mucha menor frecuencia) en la misma cadena. Es decir, las RT's pueden sintetizar polinucleótidos mixtos (o ribo-desíxirribo-polinucleótidos) como los de la Figura 28.

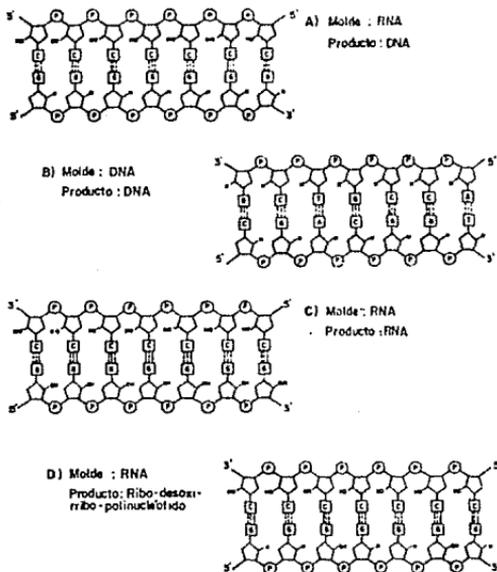


Figura 28. ACTIVIDADES ENZIMATICAS DE LA RT. (A) actividad de DNA polimeraza RNA-dependiente; (B) actividad de DNA polimeraza DNA-dependiente; (C) actividad de RNA polimerasa RNA-dependiente, es decir de replicasa y (D) probable actividad donde se incorporan tanto ribonucleótidos como desoxirribonucleótidos en la misma cadena. A y B son actividades naturales, C se induce *in vitro* con manganeso y D, se predice su inducción *in vitro* con magnesio y manganeso simultáneamente; probablemente esta última actividad ocurre también intracelularmente.

Existen al menos otras dos polimerasas que forman este tipo de polímeros *in vitro*: la primasa de *E. coli* (Rowen y Kornberg, 1978) y una DNA polimerasa (Berg *et al.*, 1963). Las implicaciones evolutivas de esta interpretación son importantes, ya que sugieren que durante la transición de RNA a DNA existieron este tipo de polinucleótidos mixtos donde en realidad lo que se transmitía con constancia eran las bases nitrogenadas debido a que la actividad de polimerasa durante ese periodo era poco específica.

En la Figura 28 aparecen las actividades que presenta la RT: DNA polimerasa RNA-dependiente, DNA polimerasa DNA-dependiente y RNA polimerasa RNA-dependiente; así como la formación de polinucleótidos mixtos que se predice. Es posible también que tenga actividad de RNA polimerasa DNA-dependiente, es decir de transcriptasa, lo que la haría una enzima ideal para el período de transición, pues podría haber intervenido tanto en los procesos de replicación de la información como en la transcripción.

Así, de acuerdo con los resultados presentados en este trabajo una reconstrucción de la etapa de transición RNA-DNA podría ser la siguiente: cuando aparece una ribonucleótido reductasa, capaz de reducir ribonucleótidos dando como producto desoxirribonucleótidos, es posible que la replicasa ancestral incorporase ambos indistintamente debido a su alta inespecificidad (Figura 29).

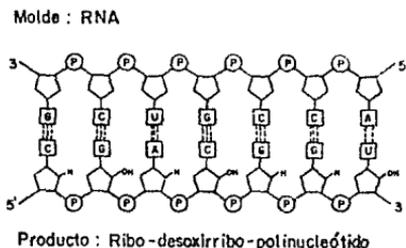


Figura 29. POSIBLE ACTIVIDAD DE POLIMERASA DURANTE LA TRANSICIÓN RNA - DNA. Posible utilización ambigua de sustratos por una polimerasa ancestral para formar rido-desoxirribopolinucleótidos, sobre un molde de RNA, DNA o bien sobre un polinucleótido mezclado producido por ella misma.

Al existir solo un tipo de nucleótidos antes de la aparición de la ribonucleótido reductasa no era necesario y por tanto no estaba presente un mecanismo que permitiera distinguir diversos tipos de nucleótidos. Presumiblemente un proceso de amplificación génica abrió la posibilidad de la especialización de ambas copias de la enzima, una de las cuales se transformó en específica para incorporar solamente ribonucleótidos (como antaño), y la otra adquirió especificidad de sustrato aceptando solamente desoxirribonucleótidos. Inicialmente ambas copias pudieron haber utilizado como molde un RNA y posiblemente también los rido-desoxirribopolinucleótidos de reciente aparición. Más tarde la que empezó a incorporar solamente desoxirribonucleótidos adquirió la capacidad de utilizar como molde, aparte de los RNAs y los híbridos mencionados,

polímeros de desoxirribonucleótidos. La descripción de esta última enzima corresponde a lo que actualmente conocemos como RT's, excepto porque usan como molde solo RNA's y DNA's de una sola hebra, bajo condiciones naturales. Un esquema del posible proceso evolutivo de los genomas celulares durante la transición RNA-DNA aparece en la Figura 30.

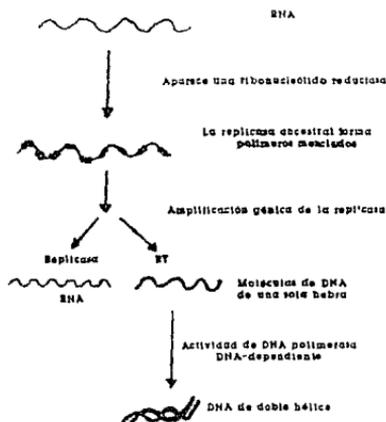


Figura 30. LA TRANSICION RNA-DNA. Posiblemente durante esta transición en el Arqueano existieron polímeros mezclados de una sola hebra. (debido a la aparición de la actividad de ribonucleótido reductasa y a la consecuente biosíntesis de desoxirribonucleótidos), como genomas que antecedieron al DNA.

Este surgimiento de la especificidad pudo verse favorecido por un cambio del cofactor metálico de manganeso a magnesio, pues posiblemente el primer cofactor de polimerasas haya sido el manganeso debido a su capacidad de actuar como cofactor en la autopóimerización de análogos de nucleótidos más eficientemente que el magnesio (Vischer y Schwartz, 1989), y a la inespecificidad que provoca. Así, el manganeso pudo haber antecedido al magnesio como cofactor en una etapa en la que la especificidad de las polimerasas no solo no era importante, sino tal vez aún inexistente; si el magnesio fue capaz de contribuir a la especificidad de estas nuevas enzimas, entonces se seleccionó a favor, desplazando al manganeso, y gracias a esto lo encontramos como cofactor de las polimerasas en todas los sistemas biológicos replicativos contemporáneos.

#### ACTIVIDAD DE REPLICASA Y GENOMAS VIRALES

Existen muchos reportes de la presencia de ribonucleótidos unidos covalentemente a moléculas de DNA, como en los casos del DNA mitocondrial (Grossman *et al.*, 1973), los colifagos T4 (Speyer *et al.*, 1972) y T5 (Rosenkranz, 1973), y el virus de rinotraqueítis bovina (Babiuk y Rouse, 1976). Por otra parte Chen y Temin (1980) encontraron ribonucleótidos tanto en la hebra + como en la - del DNA del virus de la necrosis del bazo (SNV). Estos hechos pueden ser explicados a luz de los resultados de este trabajo, pues demuestran que

una RT normal en presencia de su cofactor natural (el magnesio) puede incorporar ribonucleótidos *in vitro*.

Así, para el primer grupo mencionado es posible que la presencia de ribonucleótidos en estos DNAs se deba a que incluso las DNA polimerasas DNA-dependientes tengan la capacidad de incorporar algunos ribonucleótidos, aunque este efecto puede ser aumentado por DNA polimerasas mutantes o bien por concentraciones muy altas de ribonucleótidos en la vecindad del sitio de polimerización (Lazcano *et al.*, 1990), causadas a su vez, posiblemente, por una disfunción catalítica o regulatoria de las ribonucleótido reductasas. En el segundo caso, la explicación es muy similar, debido a que las RT's son enzimas mucho más inespecíficas como lo muestran su elevada tasa de error y la posibilidad de inducir en ellas actividad de replicasa. Por otro lado la actividad de RNA replicasa en presencia de magnesio llevada a cabo por la RT de VIH-1 permite predecir la existencia de ribonucleótidos en el DNA viral de células humanas infectadas con este virus, como los linfocitos T y los macrófagos. La importancia de esta predicción reside en que más allá de la tasa de error de la RT que genera mucha variabilidad en estos virus (dificultando por tanto una respuesta inmune efectiva), la capacidad de incorporar ribonucleótidos puede contribuir también a esta diversidad. Esta propiedad podría volverse en contra de los virus, ya que el enlace 3'-5' donde está involucrada la ribosa es mucho más lábil, y si llega a ser muy alta la incorporación de ribonucleótidos intracelularmente, el DNA viral sería rápidamente degradado impidiendo su integración al genoma celular; incidentalmente los fragmentos resultantes de este DNA degradado tendrían al menos un ribonucleótido, preferencialmente en el extremo 3' OH libre. Esto implica que las RT's mutantes con una capacidad elevada de incorporar ribonucleótidos, deben seleccionarse fuertemente en contra. Lo anterior puede ser una de las razones por las que la RT es la proteína más conservada evolutivamente de todas las que codifican los retroides.

#### IMPLICACIONES DE LA INHIBICION DE LA ACTIVIDAD DE RT EN PRESENCIA DE MANGANESO.

El análisis del efecto de los cofactores simultáneamente sobre las actividades enzimáticas de la RT del AMV, arrojó resultados interesantes. Cuando se mantiene la concentración óptima de magnesio para la actividad de RT de la AMV y se agregan además diversas concentraciones de manganeso hay un efecto inhibitorio progresivo conforme aumenta la concentración de éste último cofactor; así, a una concentración de 1mM de manganeso hay una inhibición del 50% de la actividad de RT. La enorme similitud en estructura y funcionamiento de la RT del VIH-1 con la RT del AMV, se manifiesta en el hecho de que ambas presentan un alto porcentaje de actividad de replicasa y pueden incorporar ribonucleótidos en presencia de manganeso; esta similitud implica que probablemente el manganeso tiene el mismo efecto inhibitorio sobre la actividad de transcripción inversa de la RT del VIH-1.

Si esto es así, entonces existe la posibilidad de interrumpir el ciclo infectivo del VIH-1, agente causal del SIDA, mediante la inhibición de la actividad de la RT aplicando manganeso. En una primera etapa experimental podría administrarse manganeso a células en cultivo infectadas con el VIH-1; si este hallazgo se confirma para la RT del VIH-1, un fármaco basado en el manganeso, o bien una dieta rica en el mismo catión sería de gran utilidad en la terapia clínica para enfermos de SIDA.

## EFFECTO DEL MAGNESIO SOBRE LA ACTIVIDAD DE REPLICASA

Cuando se mantuvo la concentración óptima de manganeso para actividad de replicasa y se agregó magnesio simultáneamente, se observó una elevación de esta actividad en el intervalo de 1 a 5 mM de magnesio (ver Resultados); este resultado confirma la observación de que en la replicación de viroides por RNA polimerasas eucariontes la presencia de manganeso además de magnesio parece ser importante (Rackwitz *et al.*, 1981; Semanick y Harper, 1984). Si se piensa nuevamente en las condiciones y características de las células primitivas, este resultado sugiere que al menos en alguna etapa de la evolución de los genomas y de las polimerasas celulares, la presencia de ambos cationes metálicos pudo haber elevado la eficiencia de polimerización llevada a cabo por este tipo de enzimas. Esto habría sido posible cuando la especificidad de sustrato era inexistente ya que solo estaba presente un tipo de nucleótidos. Así, durante la evolución de los catalizadores implicados en la replicación de genomas pudo haber existido una etapa en la que estaban presentes ambos cofactores (Figura 31).

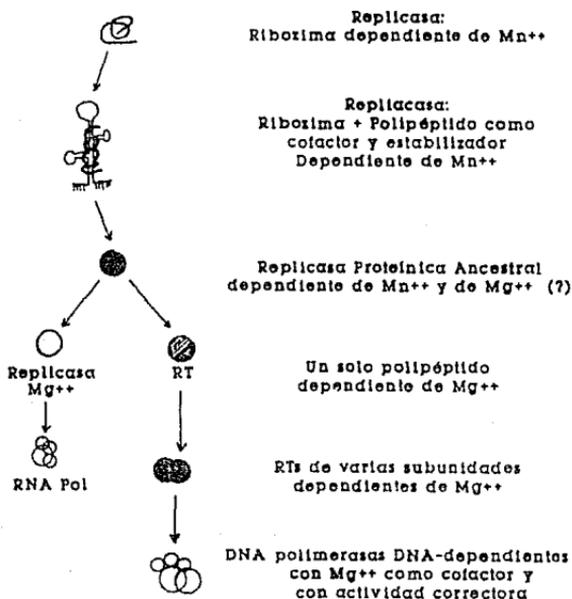


Figura 31. ORIGEN Y EVOLUCION DE POLIMERASAS. La primera polimerasa posiblemente fué una ribozima con actividad de RNA replicasa dependiente de manganeso. Posteriormente se pudo haber agregado un polipéptido; más tarde éste último pasó a ser el componente fundamental, si no, el único. A través de sucesivas ampliaciones génicas y cambios conformacionales en los que pudieron estar involucrados cationes metálicos, surgió una diversidad de polimerasas adaptadas específicamente a las diversas combinaciones molde-sustrato.

## DIVERSIDAD DE SUBSTRATOS Y ESPECIFICIDAD

Si, como se mencionó anteriormente, la aparición de la RT y de las DNA polimerasas en general dependió de la aparición del sustrato correspondiente, entonces es posible que la especificidad de las polimerasas en su origen solo dependiera de la abundancia del tipo de nucleótidos y/o de moléculas análogas presentes en la célula. Es decir, el surgimiento de la actividad de DNA polimerasa, independientemente del molde sobre el cual se realizara, dependió solamente de la aparición de vías biosintéticas que llevaran a la formación de desoxirribonucleótidos. Si generalizamos este argumento, podríamos decir que la evolución de la especificidad en los catalizadores biológicos ha dependido de, por lo menos: 1) del tipo de catalizadores (desde cationes metálicos, RNA's y proteínas); 2) la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria; 3) la diversidad de sustratos susceptibles de ser utilizados; 4) los mecanismos de regulación que controlen la concentración de dichos sustratos en diversas etapas del ciclo celular, y en diversos microambientes celulares; y 5) presencia de cofactores que contribuyeron a aumentar la especificidad y que, por tanto, fueron seleccionados a favor, durante las primeras etapas de evolución celular.

## AMBIGÜIDADES DE SUBSTRATO Y MOLDE DE DIVERSAS POLIMERASAS

Los resultados de este y otros trabajos (ver Tabla 5) muestran que en realidad las funciones de las polimerasas son intercambiables entre sí, bajo ciertas condiciones; así, una DNA polimerasa DNA-dependiente se puede transformar en reverso transcriptasa, una RNA polimerasa y una RT son capaces de funcionar como replicasas. Esta flexibilidad relativa en cuanto a la utilización de varios moldes y sustratos diferentes se puede interpretar como una evidencia del origen común de todas las polimerasas.

Si el hallazgo de ribonucleótidos en moléculas de DNA no se debe a polimerasas mutantes, sino a una incorporación natural pero poco frecuente, esto implica que la especificidad no es absoluta y que se desarrolla a la par de la evolución de las propias enzimas, tal como lo ha propuesto Jensen (1976). En la diversificación de las polimerasas, a cada evento de amplificación génica pudo haber seguido un proceso de adquisición de especificidad por un molde y un sustrato nuevos, por parte de, al menos, una de las copias de la enzima ahora existentes. Así, los resultados de este trabajo con respecto a la especificidad, apoyan la idea de que en un principio las enzimas podían aceptar una variedad de sustratos parecidos, es decir tenían gran ambigüedad de sustrato, lo que ha permitido el surgimiento de nuevas enzimas con mayor especificidad y la consecuente diversificación del metabolismo celular (Jensen, 1976). En el caso de las polimerasas esto pudo haber permitido, por un lado la evolución de las moléculas informativas, y por otro el surgimiento y evolución de los mecanismos de transmisión de la información genética en las células.

## CONCLUSIONES

Por todo lo anterior se puede concluir que:

1) La RT es una enzima cuyo origen puede situarse en el Arqueano, durante la transición RNA-DNA; las evidencias que apoyan esta idea son: a) una tasa de error más alta que otras polimerasas; b) una tasa de elongación muy baja en comparación con otras polimerasas; y c) presenta la actividad de replicasa más alta, que se interpreta como vestigial, reportada para polimerasas e inducida por manganeso.

2) Debido a su bajo peso molecular y a las tres propiedades citadas arriba, la RT resulta un excelente modelo experimental de la replicasa ancestral, es decir, de la primera enzima proteínica que polimerizaba nucleótidos, y que sustituyó en sus funciones a las ribozimas y precediendo a su vez a las polimerasas contemporáneas altamente específicas, que surgieron a partir de dicha replicasa.

3) El hecho de que tanto la RT del VIH-1 como la del AMV tengan una alta actividad de replicasa en presencia de manganeso, es un indicador más de su similitud en estructura, así como de su origen común.

4) Ya que el cambio de especificidad puede inducirse en otras polimerasas (Tabla 5), estos resultados podrían extenderse a la totalidad de las polimerasas actuales, lo cual sería una evidencia más del origen común de este conjunto de enzimas.

5) La capacidad de las RT's para actuar como replicasas aún en presencia de su cofactor natural implica que posiblemente en condiciones intracelulares sintetiza polímeros mezclados con ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos en la misma cadena.

6) Los ribonucleótidos encontrados en genomas de DNA (virales y mitocondriales) han sido incorporados por sus propias RT's o DNA polimerasas DNA-dependientes; en el caso de los virus, que esto contribuye a su tasa de error, pues los polímeros de esta clase son menos estables.

7) Durante la transición RNA-DNA se presentó una etapa intermedia (que posiblemente desapareció rápidamente) en la que los genomas estuvieron formados por ribo-desoxiribo-polinucleótidos, donde lo que se transmitía con constancia eran solamente las bases nitrogenadas y no la cadena azúcar-fosfato.

8) La extraordinaria especificidad de las polimerasas y de las proteínas en general, no es absoluta; es una propiedad que ha evolucionado en estas moléculas dentro de las células a través de la diversificación de dichos catalizadores.

9) El hecho de que algunos catalizadores inorgánicos como el manganeso sean altamente inespecíficos, a la vez que muy eficientes en la polimerización de análogos de nucleótidos, apoya la idea de que dicho cofactor pudo haber antecedido al magnesio ya que su presencia favorece la incorporación de ribonucleótidos (Valverde *et al.*, 1989). Es posible que en el curso de la evolución ambos cofactores hayan coexistido, hasta que, finalmente, el magnesio desplazó al manganeso como cofactor de las polimerasas.

## PERSPECTIVAS

En este punto quedan por realizar los siguientes experimentos:

1) Purificación total de la RT del VIH-1, agregando a los procesos aplicados a los extractos una cromatografía con DNA-celulosa, o bien una columna cromatográfica de afinidad con anticuerpos contra la RT;

2) Repetición de los experimentos con esta RT homogénea;

3) Inhibición de la actividad enzimática de la RT del VIH-1 pura con manganeso;

4) Ensayos de incorporación de ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos en la misma cadena utilizando como molde tanto RNA como DNA, por un lado en presencia de magnesio y por otro lado en presencia de manganeso, así como de ambos;

5) Inducir actividad de RNA polimerasa DNA-dependiente, es decir de transcricriptasa, con manganeso; esto apoyaría la idea del origen de la RT durante el Arqueano como una enzima útil en varios de los procesos de transmisión de la información genética.

6) Realizar ensayos con inducción de cambio de especificidad con otras polimerasas para confirmar la ambigüedad de estas enzimas y generalizar las conclusiones que de ella se desprenden.

## REFERENCIAS

- Alberts, B. M. (1986). The function of the hereditary materials: biological catalyses reflect the cell's evolutionary history. *Am. Zool.* 26:781-796
- Argos, P. (1988). A sequence motif in many polymerases. *Nucl. Acids Res.* 16:9909-9916
- Babiuk, L. A., Rouse, B. T. (1976). Ribonucleotides in infectious bovine rhinotracheitis virus DNA. *J. Gen. Virol.* 31:221-230
- Baltimore, D. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumor viruses. *Nature* 226:1209-1211
- Basu, A., Nanduri, V. B., Gerard, G. F., Modak, M.J. (1988). Substrate binding domain of murine leukemia virus reverse transcriptase. *J. Biol. Chem.* 263:1648-1653
- Berg, P., Fancher, H., Chamberlin, M. (1963). The synthesis of mixed polynucleotides containing ribo and deoxyribonucleotides by purified preparations of DNA polymerase of *Escherichia coli*. En: Vogel, H.J., Bryson, V., y Lampen, J. O. (eds) *Informational Macromolecules*. Academic Press, New York
- Biebricher, K. C., Orgel, L. E. (1973). An RNA that multiplies indefinitely with DNA-dependent RNA polymerase: selection from a random copolymer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70:934-937
- Bolívar, F., Rodríguez, R., Greene, P. J., Betlach, M., Heynecker, H., Boyer, A. W., Croso, J., Falkow, S. (1977). Construction of new cloning vehicles II. A Multipurpose Cloning System. *Gene* 2:95-113
- Brosius, J., Dull, T., Slechter, D. D., Noller, H. F. (1981). Gene Organization and Primary Structure of a Ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J. Mol. Evol.* 14:107-127
- Cech, T. R., Zaug, A. J., Grabowski, P. J. (1982). *In vitro* Splicing of the Ribosomal RNA Precursor of *Tetrahymena*: Involvement of a Guanosine Nucleotide in the excision of the Intervening Sequence. *Cell* 26:487-496
- Cedergren, R., Grosjean, H. (1987). On the primacy of primordial RNA. *BioSystems* 20:175-180
- Certa, U., Bannwarth, W., Stücker, D., Gentz, R., Lanzer, M., Le Gricc, S. F. J., Guillot, F., Wendler, I., Hunsmann, G., Bujard, H., Mous, J. (1986). Subregions of a conserved part of the gp41 transmembrane protein are differentially recognized by antibodies of infected individuals. *EMBO J.* 5:3051-3056
- Chamberlin, M.J. (1982). Bacterial DNA-dependent RNA polymerases. En: Boyer, P. D. (ed.) *The Enzymes XI/B*. Academic Press, New York.
- Chen, I. S., Temin, H. E. (1980). Ribonucleotides in unintegrated linear spleen necrosis virus DNA. *J. Virol.* 33:1058-1073
- Cheng, Y., Ginger, E.D., Kennedy, F. B., Sarngadharan, M. G., Ting, Y. C. T. (1987). Human Immunodeficiency Virus Reverse Transcriptase. *J. Biol. Chem.* 262:2187
- Crick, F. H. C. (1958). The Biological Replication of Macromolecules. En: *Symp. Soc. Exp. Biol.*, XII 138
- Crick, F. H. C. (1968). The origin of the genetic code. *J. Mol. Biol.* 38:367-369
- Crick, F. (1970). Central Dogma of Molecular Biology. *Nature* 227:561-563

- Darnell, J.E., y Doolittle, W. F. (1986). Speculations on the early course of evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:1271-1275
- Deamer, D. W., y Or6, J. (1980). Role of lipids in prebiotic structures. *BioSystems* 12:167-175
- Di marzo Varone, F., Copeland, T. D., DE Vico, A. L., Rahman, R., Groszlan, S., Gallo, R. C., Sarngadharan, M. G. (1986). Characterization of Highly Immunogenic p66/51 as the Reverse Transcriptase of HTLV-III/LAV. *Science* 231:1289-1291
- Doolittle, R. F., Feng, D.F., Johnson, M. S., y McClure, M. A. (1989). Origins and Evolutionary relationships of retroviruses. *Quart. Rev. Biol.* 64:1-30
- Edenberg, H. J., Huberman, J. A. (1975). Eukaryotic chromosome replication. *Annu. Rev. Genet.* 9:245-284
- Eigen, M., Gardiner, W., Scuster, P., Winkler-Oswatitsch, R. (1981). The origin of genetic information. *Sci. Am.* 244:88-118
- Fox, S. W., Dose, K. (1977). *Molecular Evolution and the Origins of Life*. Decker, New York.
- Fuetterer, J., y Hohn, T. (1987). Involvement of nucleocapsids in reverse transcription: a general phenomenon? *TIBS* 12:92-95
- Gallo, R. C. (1987). El virus del SIDA. *Investigación y Ciencia* Número 126:31-41
- Gardiner, K. J., Marsh, T. I., Pace, N. R. (1985). Ion dependence of the *Bacillus subtilis* RNase P reaction. *J. Biol. Chem.* 269:5415-5419
- Gerard, G. F., Rottman, F., Green, M. (1976). Poly(2'-O-methylcytidilate) oligodeoxiguanilate as a template for the ribonucleic acid directed deoxyribonucleic acid polymerase in ribonucleic acid tumor virus particles and a specific probe for the ribonucleic acid directed enzyme in transformed murine cell. *Biochemistry* 13:1632-1641
- Gilbert, W. (1986). The RNA world. *Nature* 319:618
- Grossman, L. I., Watson, R., Vingorad, J. (1973). The presence of ribonucleotides in mature closed circular mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. UAS* 70:3339-3343
- Guerrir-Takada, C., Altman, S. (1984). Catalytic Activity of an RNA molecule Prepared by Transcription *in vitro*. *Science* 223:285-286
- Guerrir-Takada, C., Gardines, K., Marsh, T., Pace, N., Altman, S. (1983). The RNA Moiety of Ribonuclease P is the Catalytic Subunit of the Enzyme. *Cell* 35:849-857
- Haldane, J. B. S. (1965). En: Fox, S. W. (ed). *The Origin of Prebiological Systems and their Molecular Matrices*. Academic Press, New York.
- Halmann, M., Sanchez, R. A. y Orgel, L. E. (1969). Phosphorilation of D-ribose in aqueous solution. *J. Org. Chem.* 34:3702-3703
- Herrera, A. L. (1942). A new theory of the origin and nature of life. *Science* 96:14
- Hizi, A., McGill, C., Hughes, S. H. (1988). Expression of soluble enzymatically active, human immunodeficiency virus reverse transcriptase in *Escherichia coli* and analysis of mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:1218-1222
- Holland, S. K., Blake, C. C. F. (1987). Proteins, exons and molecular evolution. *BioSystems* 20:181-206
- Holland, J., Spindler, K., Horodyski, F., Graban, E., Nichols, S., Vandepol, S. (1982). Rapid evolution of RNA genomes. *Science* 215:1577-1585

- Hung, P. P. (1971). Ribonucleases of Rous Sarcoma Virus. *Virology* 51:287
- Inokuchi, Y., Hirashima, A. (1987). Interference with viral infectin by defective RNA replicase. *J. Virol.* 61:3946-3949
- Inouye, S., Hsu, M.-Y., Eagle, S., Inouye, M. (1988). Reverse transcriptase associated with the biosynthesis of the branched RNA-linked msDNA in *Myxococcus xantus* *Cell* 56:706-717
- Jensen, R. A. (1976). Enzyme Recruitment in Evolution of New Function. *Ann. Rev. Microbiol.* 30:409-425.
- Joyce, G. F., Schwartz, A. W., Miller, S. L., y Orgel, L. E. (1987). The case for an ancestral genetic system involving simple analogues of the nucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:4398-4402
- Karkas, J. D. (1973). Reverse Transcription by *Escherichia coli* DNA polymerase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70:3834-3838
- Kiesling, A. A., Goulian, M. (1976). A comparison of the enzymatic responses of the DNA polymerases from four RNA tumor viruses. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 71:1096-1077
- Konarska, M. M., Sharp, P. A. (1989). Replication of RNA by the DNA-Dependent RNA polymerase of Phage T7. *Cell* 57:423-431
- Kornberg, A. (1984). DNA replication. *TIBS* 9:122-124
- Kornberg, A. (1988). DNA replication. *J. Biol. Chem.* 263:1-4
- Krueger, K., Grabousky, P., Zaug, A., Gottschling, D., Cech, T. (1982). Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena* *Cell* 31:147-157
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Lampson, B. C., Inouye, M., Inouye, S. (1989). Reverse transcriptase with concomitant ribonuclease H activity in the cell-free synthesis of branched RNA-linked msDNA in *Myxococcus xantus* *Cell* 56:701-707
- Lampson, B. C., Sun, J., Hsu, M., Vallejo-Ramírez, J., Inouye, S., Inouye, M. (1989). Reverse Transcriptase in a clinical strain of *Escherichia coli*: Production of branched RNA-linked msDNA. *Science* 243:1033-1038
- Larder, B., Purifoy, D., Powell, K., Darby, G. (1987). AIDS virus reverse transcriptase defined by high level expression in *Escherichia coli* *EMBO J.* 6:3133-3137
- Lazcano, A. (1986). Prebiotic evolution and the origin of cells. *Tiballs Soc. Cut. Biol.* 39:73-103
- Lazcano, A., Guerrero, R., Margulis, L., Oró, J. (1988a). The evolutionary transition from RNA to DNA in early cells. *J. Mol. Evol.* 27:283-290
- Lazcano, A., Fastag, J., Gariglio, P., Ramirez, C., y Oró, J. (1988b). On the early evolution of RNA polymerase. *J. Mol. Evol.* 27:365-376
- Lazcano, A., Gariglio, P., Orozco, E., Oró, J. (1989). On the early evolution of reverse transcriptase. Abstracts of the 6th Meeting of the International Society for the Study of the Origins of Life, Praga, Checoslovaquia. Julio 3-8, 1989:166-167
- Lazcano, A., Valverde, V., Greco-Hernández, Gariglio, P., Fox, G.E., y Oró, J. (1990). On the Early Emergence of Reverse Transcription: Theoretical and experimental evidence. *J. Mol. Evol.* (enviado)

- Le Grice, S. F. J., Verena, B., Mous, J. (1987). Expression of biologically active human T-cell lymphotropic virus type III reverse transcriptase in *Bacillus subtilis*. *Gene* 55:95-103
- Leuthardt, A., Le Grice, S. F. J. (1988). Biosynthesis and analysis of a genetically engineered HIV-1 reverse transcriptase/endonuclease polyprotein in *Escherichia coli*. *Gene* 68:35-42
- Lightfoote, M. M., Coligan, J. E., Folks, T. M., Fauci, A. S., Martin, M. A., Venkatesan, S. (1986). Structural Characterization of Reverse Transcriptase and Endonuclease Polypeptides of the Acquired Immunodeficiency Syndrome Retrovirus. *J. Virol.* 69:771-775
- Llaca, V., Silva, E., Lazcano, A., Rangel, L. M., Gariglio, P., Oró, J. (1987). In search of the ancestral RNA polymerase: an experimental approach. En: Eirich, F., Ponnampereuma (eds) *Prebiological Organization: Proceedings of the VIII College Park Colloquium on Chemical Evolution* (en prensa)
- Loeb, L. A., Mildvan, A. S. (1981). The role of metal ions in the fidelity of DNA and RNA synthesis. En: Eichhorn, G. L., Manzilli, L. G. (eds). *Metal Ions in Genetic Information Transfer*. Elsevier/North Holland, New York, 340 pp.
- Loeb, L. A., Tartof, K. D., Travaglini, E. C. (1973). Copying Natural RNAs with *E. coli* DNA polymerase I. *Nat. New Biol.* 242:66-69
- Loeb, L. A., Zakour, R. A. (1980). Metals and Genetic Miscoding. En: Spiro, T. G. (ed) *Nucleic Acid-Metal Ion Interactions*. John Wiley and Sons, New York.
- Margulis, L., Schwartz, K. (1982). *Five kingdoms*. Freeman, New York.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J. (1982) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- McClure, M. A., Johnson, M. S., Feng, D. F., Doolittle, R. F. (1988). Sequence comparisons of retroviral proteins: Relative rates of change and general phylogeny. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2469-2473
- Mizutani, S., Boettiger, D., Temin, H. M. (1970). DNA-dependent DNA polymerase and DNA endonuclease in virions of Rous Sarcoma virus. *Nature* 229:424-427
- Mizutani, S., Temin, H. M. (1971). Enzymes and Nucleotides in Virions of Rous Sarcoma. *J. Virol* 8:409
- Mizutani, S., Temin, H. M., Kodama, M., Wells, R. D. (1971). DNA ligase and exonuclease activities in the virions Rous Sarcoma virus. *Nat. New Biol.* 230:232
- Nisbet, E. G. (1986). RNA and hot-water spring. *Nature* 322:206
- Oparin, A. I. (1936). *The Origin of Life*. MacMillan, New York
- Oparin, A. I. (1961). *Life: Its Nature, Origin and Development*. Oliver and Boyd, Edinburg.
- Orgel, L. E. (1968). Evolution of the Genetic apparatus. *J. Mol. Biol.* 38:380
- Oró, J., Miller, S. L., y Lazcano, A. (1990). The origin and early evolution of life on Earth. *Annu. Rev. Earth Planet Sci.* 18:317-356
- Pace, N. R., Marsh, T. L. (1985). RNA catalysis and the origin of life. *Origins of Life* 16:97-116
- Peschke, V., Beuck, V., Bujard, H., Gentz, R., Le Grice, S. (1985). Efficient utilization of *Escherichia coli* transcriptional signals in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* 186:547-555.
- Preston, D. B., Poesz, J. B., Loeb, L. A. (1988). Fidelity of HIV-1 Reverse Transcriptase. *Science* 242:1168-1170

- Rackwitz, H. R., Rohde, W., Sanger, T. (1981). DNA-dependent RNA polymerases of plant origin transcribes viroid RNA into full-length copies. *Nature* 291:297-301
- Ratner, L., Haseltine, W., Patrarca, R., Livak, K. J., Starcich, B., Josephs, S. F., Doran, E. R., Rafalski, J. A., Whitehorn, E. A., Baumcister, K., Ivanoff, L., Petteway Jr., S. R., Pearson, M. L., Lautenberger, J. A., Papas, T. S., Ghrayeb, J., Chang, N. T., Gallo, R. C., Wong-Staal, F. (1985). Complete nucleotide sequence of the AIDS virus HTLV-III. *Nature* 313:227-284
- Roberts, J. D., Katarzyna, B., y Kunkel, T. A. (1988). The accuracy of Reverse Transcriptase from HIV-1. *Science* 242:1171-1173
- Rosenkranz, H. S. (1973). RNA in coliphage T5. *Nature* 242:327-329
- Rowen, L., Kornberg, A. (1978). A robo-deoxirribonucleotide primer synthesized by Primase. *J. Biol. Chem.* 253:770-774
- Sarnagadharan, M. G., Allauden, H. S., Gallo, R. C. (1976). Reverse Transcriptase activity of RNA tumor viruses in animal cells. *Methods. in Cancer Res.* 12:3-47
- Schön, A., Krupp, G., Gough, S., Berry-Lowe, S., Kannagara, C. G. y Söll, D. (1986). The RNA required in the first step of chlorophyll biosynthesis is a chloroplast glutamate tRNA. *Nature* 322:281-284
- Schwartz, A. W., y Orgel, L. E. (1985). Template-Directed Synthesis of Novel, Nucleic Acid-Like Structures. *Science* 228:585
- Schwartz, A. W., Vischer, J., Bakker, C. G., Niessen, J. (1987). Nucleic acid-like structures II. Polynucleotides analogues as possible primitive precursors of nucleic acids. *Origins Life* 17:351-357
- Semanick, J. S., Harper, K. L. (1984). Optimal condition for cellfree synthesis of citrus exocortis viroid and the question of specificity of RNA polymerase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:4429-4433
- Shvedova, T. A., Korneeva, G. A., Otruschenko, V. A. y Venkstern, T. V. (1987). Catalytic activity of the nucleic acid component of the 1,4-glucan branching enzyme from rabbit muscles. *Nucl. Acid. Res.* 15: 1475-1752
- Slater, J. A., Tamir, P., Loeb, L. A., Mildvan, A. S. (1972). The Mechanism of *Escherichia coli* Deoxyribonucleic Acid Polymerase I. Magnetic Resonance and Kinetic Studies of the role of Metals. *J. Biol. Chem.* 247:6784-6794
- Sloan, D. L., Loeb, L. A., Mildvan, A. S., Feldman, R. F. (1975). Conformation of Deoxynucleoside Triphosphate Substrates on DNA Polymerase I from *Escherichia coli* as Determined by nuclear Magnetic Relaxation. *J. Biol. Chem.* 250:8913
- Smith, T. F., Srinivasan, A., Schochetman, G., Marcus, M., Myers, G. (1988). The phylogenetic history of immunodeficiency viruses. *Nature* 333:573-575
- Speyer, J. F., Chao, J., Chao, L. (1972). Ribonucleotides covalently linked to deoxyribonucleic acid in T4 bacteriophage. *J. Virol.* 10:902-908
- Strand, M., August, J. J. (1971). Protein Kinase and Phosphate Acceptor Proteins in Rauscher Murine Leukemia Virus. *Nat. New. Biol.* 233:137-140

- Stüeber, D., Ibrahim, I., Cutler, D., Dobberstein, B., Bujard, H. (1984). A novel *in vitro* transcription-translation system: accurate and efficient synthesis of single proteins from cloned DNA sequences. *EMBO J.* 3:3143-3148
- Tanese, N., Goff, S. P. (1988). Domain structure of the moloney murine leukemia virus reverse transcriptase: mutational analysis and separate expression of the DNA polymerase and RNase H activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:1777-1781
- Temin, H. M. (1989). Retrons in bacteria. *Nature* 339:254-255
- Temin, H. M., Mizutani, M. (1970). RNA directed DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 226:1211-1213
- Valverde, V., Greco-Hernández, Oró, J., Gariglio, P., Lazcano, A. (1989). Caracterización de la actividad de RNA replicasa que la reverso transcriptasa del VIH-1 presenta *in vitro*. Resúmenes del II Congreso Nacional Sobre SIDA-VIH. México, D. F., Noviembre 13-16, 1989.
- Varela, F., Maturana, H. (1973). Autopoiesis: The organization of living system, its characterization and a model. *BioSystems* 5:187-196
- Varmus, H. E., Swanstrom, R. (1982). Replication of retroviruses. En: Weiss, R., Teich, N., Varmus, H., Coffin, J. (eds) *RNA tumor viruses* vol. 1. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Varmus, H. (1987). Reverse Transcription. *Sci. Am.* 257:56-64
- Varmus, H. (1989). Reverse Transcription in bacteria. *Cell* 56:721-724
- Verma, I. M. (1977). The reverse transcriptase. *Biochem. Biophys. Acta.* 473:1-38
- Vischer, J., Schwartz, A. W. (1988). Template-Directed Synthesis of Acyclic Oligonucleotide Analogues. *J. Mol. Evol.* 28:3-6
- Visscher, J., Van Der Woerd, R., Bakker, C. G., Schwartz, A. W. (1989). Oligomerization of Deoxynucleoside-Biphosphate Dimers: Template and Linkage Specificity. *Origins of Life* 19:3-6
- Visscher, J., Schwartz, A. W. (1989). Manganese-Catalyzed Oligomerization of Nucleotide Analogs. *J. Mol. Evol.* 29:284-287
- Wang, T.S.F., Wong, S.W., y Korn, D. (1989). Human DNA polymerase alpha: predicted functional domains and relationships with viral DNA polymerases. *FASEB J.* 3:14-21
- Weber, K., Pringle, J. R., Osborn, M. (1972). Measurement of molecular weights by electrophoresis on SDS-Acrylamide gel. *Methods Enzymol.* 26:3-67
- Weiner, A. M. (1987). The origins of life. En: Watson, J. D., Hopkins, N. H., Roberts, J. W., Steitz, J. A., y Weiner, A. M. *The Molecular Biology of the Gene*, vol. II. Benjamin Cummings, Menlo Park CA, pp1098-1160.
- White, D. H. (1980). A Theory for the Origin of a self Replicating System. I Natural Selection of the Autogen from Short, Random Oligomers
- White, D. H., y Erickson, J. C. (1981). Enhancement of peptide bond formation by poliribonucleotides on clay surfaces in fluctuating environments. *J. Mol. Evol.* 17:19-26
- White, H. B. (1976). Coenzymes as Fossils of an Earlier Metabolic State. *J. Mol. Evol.* 7:101
- White, H. B. III (1982). En: *The Pyridine Nucleotide Coenzymes* Academic Press, New York.

- Wintersberger, V., y Wintersberger, E. (1987). RNA makes DNA: a speculative view of the evolution of DNA replication mechanisms. *Trends in Genetics* 3:198-202
- Wong, S. W., Wahl, A. F., Yuan, M.P., Arai, N., Pearson, B. E., Arai, K., Korn, D., Hunkapiller, M. W., Wang, T.S.F. (1988). Human DNA polymerase alpha gene expression is cell proliferation dependent and its primary structure is similar to both prokaryotic and eukaryotic replicative DNA polymerases. *EMBO J.* 7:37-47.
- Wray, W., Boulikas, T., Wray, V.P., Hancock, R. (1981). Silver staining of proteins in polyacrilamide gels. *Anal. Biochem.* 118:197-203
- Xiong, Y., y Eickbush, T. H. (1988). Similarity of reverse transcriptase-like sequences of viruses, transposable elements, and mitochondrial introns. *Mol. Biol. Evol.* 5: 675-690
- Yee, T., Furuichi, S., Inouye, S., Inouye, M. (1984). Multicopy Single-Stranded DNA Isolated from a Gram Bacterium, *Mycococcus xanthus*. *Cell* 38:203
- Zaug, A. J., Cech, T. R. (1982). The intervening sequence from the ribosomal RNA precursor of *Tetrahymena* contains a 5' terminal guanosine residue not encoded by the DNA. *Nucl. Acid. Res.* 10:2823
- Zaug, A. J., Cech, T. R. (1986). The intervening sequence of *Tetrahymena* is an enzyme. *Science* 231:470-475
- Zaug, A. J., Grabouski, P. J., Cech, T. R. (1983). Autocatalytic cyclization of an excised intrveining sequence RNA is a cleavage-ligation reaction *Nature* 301:578-583
- Zavriev, S. K., y Borisova, O. V. (1987). Possible functional role of the "DD" domain of RNA dependent polymerasaes. *Molekulyarnaya Biologiya* 21:229-241 (Traducción inglesa)
- Zielinsky, W. S. y Orgel, L. E. (1987). Autocatalytic synthesis of a tetranucleotide analogue. *Nature* 327:346-34