

60
24



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Origen común de las polinucleótido-fosforilasas
de eubacterias y arqueobacterias

T E S I S

Que para obtener el título de

BIOLOGA

presenta:

María del Pilar Francino Puget

México. D. F. 1992.

TESIS CON
FOLIO DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

CONTENIDO

Pág.

RESUMEN

ABREVIATURAS

I. INTRODUCCION	1
II. HIPOTESIS.....	20
III. OBJETIVOS.....	21
IV. MATERIALES Y METODOS.....	23
CULTIVO DE <u>Halobacterium halobium</u>	23
AISLAMIENTO DE LA POLINUCLEOTIDO-FOSFORILASA.....	24
DETECCION DE LA PNPasa in situ.....	25
ELECTROFORESIS E INMUNODETECCION.....	27
ANTICUERPOS MONOCLONALES.....	29
V. RESULTADOS Y DISCUSION.....	30
VI. CONCLUSIONES.....	39
VII. REFERENCIAS.....	45
VIII. APENDICE.....	50
MEDIO DE CULTIVO DE <u>H. halobium</u> (ATCC 29341).....	50
GELES NATIVOS CONTINUOS DE POLIACRILAMIDA AL 10%..	50

GELES DISCONTINUOS DE POLIACRILAMIDA.....	51
A. GEL SEPARADOR.....	51
B. GEL CONCENTRADOR.....	51
C. AMORTIGUADORES.....	51

RESUMEN

En este trabajo se presentan evidencias inmunológicas del origen monofilético de las polinucleótido fosforilasas de una eubacteria (Escherichia coli) y una arqueobacteria (Halobacterium halobium). Este resultado implica que el último ancestro común a los tres linajes celulares actuales ya presentaba esta enzima, lo que le permitiría tener un recambio efectivo de las moléculas de RNA. Ello sugiere que este ancestro era un organismo complejo, con un nivel básico de organización similar al de los procariontes actuales.

ABREVIATURAS

ADP	Difosfato de adenosina
AMP	Monofosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
DNA	Acido desoxirribonucleico
DNasa I	Desoxirribonucleasa I
EDTA	Acido etilendiamino tetracético
EF-G	Factor de elongación G
EF-Tu	Factor de elongación Tu
Fig.	Figura
g	Gravedad
hnRNA	Acido ribonucleico heterogéneo nuclear
mRNA	Acido ribonucleico mensajero
NTP	Nucleósido trifosfato
Pi	Fosfato inorgánico
PNPasa	Polinucleótido-fosforilasa
RNasa II	Ribonucleasa II
RNA	Acido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
rRNA	Acido ribonucleico ribosomal
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
tRNA	Acido ribonucleico de transferencia
Tris	Tris (hidroximetil) amino metano

I. INTRODUCCION

Al comparar las características bioquímicas y genéticas básicas de los seres vivos actuales, su extraordinaria similitud nos sugiere su origen común. Es decir, en algún momento de la historia de la vida, probablemente existió una población de organismos antecesora de todas las formas de vida que conocemos. Para entender el posible nivel de complejidad existente en aquellas células ancestrales, la mejor alternativa posible es fijarnos en las características presentes en los organismos actuales: si podemos distinguir los rasgos derivados por transporte horizontal, las

características homólogas comunes a todas las ramas actuales deben haber existido ya en su ancestro común. Entonces, ¿cuántas y cuáles son las homologíaes entre los grandes grupos de organismos actuales?

Desde que comenzaron los estudios de Woese et al. (1976), donde inicialmente se compararon los catálogos de nucleótidos obtenidos por digestión del 16s rRNA, se reconoció la existencia de tres tipos celulares correspondientes a tres linajes monofiléticos: las arqueobacterias, las eubacterias y el nucleocitoplasma eucarionte. Sin embargo, la topología del árbol filogenético que reúne a estos tres grupos no se pudo establecer sino hasta fecha reciente, cuando Gogarten et al. (1989), por un lado, e Iwabe et al. (1989), por otro, propusieron árboles elaborados con secuencias de pares de genes parálogos, de manera que uno sirviera para darle una raíz al otro. En estos árboles es evidente que existe una relación más cercana entre arqueobacterias y eucariontes que entre cualquiera de éstos y las eubacterias. Esto implica que la filogenia de los tres linajes celulares en su nivel más general se puede resumir de la siguiente manera: un primer evento de divergencia, que probablemente tuvo lugar en el Arqueano temprano (Lazcano et al., 1992), separó a los

ancestros de las eubacterias de los de arqueobacterias y eucariontes; una segunda divergencia más reciente separó a los ancestros de estos dos últimos grupos.

Ello sugiere que debemos de buscar las características presentes en el último ancestro común en aquellos rasgos homólogos entre eubacterias y cualquiera de los otros dos grupos, o, de preferencia, entre los tres linajes. Además, como argumenta Woese (1987), podemos discernir entre las características centrales, ya bien definidas desde el ancestro, y las que existían sólo en forma incipiente en éste. Woese (1987) ejemplifica el primer caso mediante el aparato de traducción, que no presenta diferencias importantes entre los tres linajes, y que es fácilmente reconocible como una función celular necesariamente antigua. En el segundo caso, las características presentes de manera incipiente en el ancestro universal, habrían seguido vías de refinamiento divergentes en el interior de cada linaje, dando como resultado funciones homólogas pero particulares para cada uno de ellos. Woese (1987) cita como ejemplo a las RNA polimerasas, que se encuentran presentes en todas las células y en muchos virus. Todas ellas funcionan de manera similar, y se han podido reconocer subunidades homólogas a β' de *Escherichia coli* entre las RNA polimerasas

de arqueobacterias, eucariontes y algunos virus (Zillig et al., 1985; Lazcano et al., 1988, 1989; Roy et al., 1988). Además, las RNA polimerasas celulares comparten entre sí y con las reverso-transcriptasas y RNA replicasas una serie de regiones conservadas, entre las que destaca el dominio -DD-, que esta formado por 14 aminoácidos (Lazcano et al., 1988; Velasco et al., 1992). Sin embargo, cada uno de los tres linajes celulares presenta un patrón característico de subunidades en la RNA polimerasa, con mayor variación entre las arqueobacterias (Woese, 1987).

Por último, es claro que las características ausentes en el último ancestro común se habrán desarrollado independientemente en cada linaje y representan casos de homoplasia entre ellos. Un ejemplo de este fenómeno es, según Woese (1987), la forma de organización genómica, que se habría desarrollado luego de la separación de los linajes, ya que el último ancestro común no enfrentaba el problema de desarrollar una estructura genómica ordenada, debido a su número reducido de genes.

En efecto, Woese y Fox (1977) y Woese (1987) plantearon que el último ancestro común fue un progenote, es decir, un sistema biológico en el cual el fenotipo y el genotipo se

encontraban, aún unidos en forma imprecisa. La existencia en algún momento de la historia de una entidad semejante se deduce de la complejidad del aparato de traducción operante en las células actuales, que debe ser el resultado de un largo proceso evolutivo. Sin embargo, hay evidencias de que han existido formas más simples de traducción (Lazcano et al., 1992), como lo prueba la homología existente entre las secuencias de los factores de elongación EF-Tu y EF-G, presentes en los tres linajes celulares y que provienen, por lo tanto, de una antigua duplicación génica, anterior a la divergencia de éstos (Lechner y Bork, 1987; Lechner et al., 1988; Iwabé et al., 1989). Es decir, existen evidencias de que el progenote, si en efecto existió, desapareció en épocas muy anteriores a la existencia del último ancestro común (Lazcano et al., 1992).

Varios autores han sugerido de manera independiente que el RNA antecedió al DNA como material genético en las células del Arqueano (cf. Lazcano, 1986), basándose en: (1) el papel central que juega el RNA en la biosíntesis de proteínas (Crick, 1968), la cual puede proceder en ausencia de DNA pero no de RNA (Spirin, 1986); (2) en la existencia de virus y viroides de RNA (Reaney, 1982; Diener, 1982); y (3) en que la síntesis de desoxirribonucleótidos siempre

procede vía; la reducción de ribonucleótidos en todos los linajes celulares (Sprengel y Follmann, 1981, Lammers y Follmann, 1983).

A partir del descubrimiento de las propiedades catalíticas del RNA (Kruger et al., 1982; Guerrier-Takada et al., 1983; Cech, 1987; Joyce, 1989a, 1989b) ha cobrado fuerza la idea de que el RNA precedió también a las proteínas, como fue replanteado por Gilbert (1986), Alberts (1986) y Lazcano (1986). Estos autores sugirieron la existencia de un aparato rudimentario de traducción surgido en células basadas en genomas de RNA, en las cuales las actividades catalítica y replicativa dependían de moléculas de RNA. Esta novedad evolutiva habría sido seleccionada a favor debido al incremento de las capacidades catalíticas que supondría el "invento" biológico de las proteínas. Posteriormente, en células con RNA y proteínas, el DNA habría sido seleccionado como molécula informacional que diera mayor estabilidad al sistema replicativo, debido a que: (1) el esqueleto del DNA es menos sensible a la hidrólisis básica (Ferris y Usher, 1983); (2) las RNA polimerasas no presentan actividad editora, lo cual lleva a una mayor mutabilidad de los genomas de RNA en comparación con los de DNA (Reaney, 1982); (3) la información tiende a

degradarse en genomas de RNA, por la reacción hidrolítica que desamina a la citosina produciendo uracilo y la falta de una enzima correctora (Kornberg, 1980); y (4) la radiación ultravioleta produce más cambios fotoquímicos en las moléculas de RNA que en las dobles hélices de DNA (Oró et al., 1990).

El progenote de Woese tenía un genoma basado en pequeñas moléculas de RNA desagregadas, con copias múltiples de un número reducido de genes que mutaban con rapidez (Woese, 1987). Para Woese, el ancestro universal no podía presentar un nivel de organización más complejo, ya que, de otra forma, no se podrían justificar las diferencias estructurales y funcionales que separan a los tres linajes celulares actuales. Es decir, si el ancestro hubiera tenido una complejidad equivalente a la de cualquiera de los linajes conocidos, los cambios requeridos para pasar de un tipo de organización a otro habrían sido demasiado drásticos y, por lo tanto seleccionados en contra, sobre todo en sus primeros pasos. En cambio, si el ancestro hubiera sido un progenote más simple y rudimentario que los organismos actuales, sin muchas de las funciones presentes hoy en día, las diferencias que observamos entre los tipos celulares actuales serían atributos que el progenote no poseía, o

poseía en forma muy primitiva, y que se desarrollaron en forma independiente en cada línea. Además, la gran mutabilidad de los genomas de RNA, permitiría un tipo de evolución rápida que daría lugar, en menos de mil millones de años, a los ancestros de cada uno de los linajes (Woese, 1987).

Sin embargo, se puede pensar que Woese atribuye un peso excesivo a las diferencias entre las células actuales, que son el punto de partida de su argumentación teórica. Para discutir la validez de su posición hay que analizar el nivel al cual se presentan estas diferencias, así como la magnitud y profundidad de las semejanzas entre los linajes. Para ello, como ya se ha mencionado, deben reconocerse las homologías entre los tres linajes.

Una similitud estadísticamente significativa entre secuencias de ácidos nucleicos o proteínas se considera como la prueba más directa de homología entre estas moléculas (Zuckerandl y Pauling, 1965). En la actualidad solo unos pocos genes presentes en los tres linajes celulares han sido secuenciados y comparados (Lazcano et al., 1992). Sin embargo, con base en los estudios que se han

podido realizar a este respecto, se concluye que el último ancestro común ya poseía (Lazcano et al 1992):

- un aparato de transcripción con una RNA polimerasa oligomérica, ribosomas complejos con varias proteínas ribosomales diferentes, y biosíntesis de proteínas modulada por dos factores de elongación;

- una H⁺-ATPasa asociada a membrana e involucrada en transporte activo, con mecanismos regulatorios;

- un complejo conjunto de enzimas, incluyendo aquellas involucradas en glucólisis, oxidación del piruvato y otras rutas principales de metabolismos heterótrofos anaerobios; y

- enzimas involucradas en las biosíntesis tanto de la histidina como del triptofano (Díaz, 1992).

Otras características que podrían haber estado presentes en el último ancestro común incluyen la biosíntesis de corrinoides (Benner et al., 1989), y un par de genes duplicados que codificaran a los tRNAs iniciador y elongador de la metionina (Iwabe et al., 1989).

Todavía no se ha demostrado tajantemente la existencia del DNA en el último ancestro común, ya que faltan por secuenciar y comparar genes claves a este respecto en las diferentes líneas de arqueobacterias, como son los que

codifican para la DNA polimerasa, las ribonucleótido reductasas y las DNA topoisomerasas. Sin embargo, varias líneas de evidencia sugieren la aparición del DNA antes de la divergencia de los tres linajes. Por un lado, estudios de sensibilidad a antibióticos sugieren que las DNA topoisomerasas de tipo II de los tres linajes son homólogas (Forterre et al., 1990). Por otra parte, la comparación de secuencias de aminoácidos entre pequeñas subunidades de las ribonucleótido reductasas de eubacterias y eucariontes demuestran que se trata de una enzima muy conservada (Carlson et al., 1984; Lin et al., 1987; Slabaugh et al., 1988); además, se conoce la existencia de una vía de síntesis de desoxirribonucleótidos mediante reducción de ribonucleótidos en arqueobacterias (Sprengel y Follmann, 1981; Elledge y Davis, 1987; Hogenkamp et al., 1987). La replicación del DNA presenta en los tres linajes el mismo esquema básico, con la participación del mismo tipo de enzimas (DNA polimerasas, DNA primasas, DNA topoisomerasas, etc.) (Oró et al., 1990). Finalmente, la complejidad con la que aparece el último ancestro común con base en las características antes citadas, en cuanto a número de genes y de funciones especializadas que presentaba, seguramente excedía las capacidades codificadoras de un genoma de RNA (Lazcano et al., 1992).

Por lo tanto, se puede pensar, al contrario de lo que afirma Woese (1987), que el último ancestro común fue un organismo complejo, con un nivel de organización celular similar al de los procariontes actuales y que ya presentaba un genoma de DNA (Lazcano et al., 1992). Como argumentan estos últimos autores, es difícil definir la línea divisoria entre un progenote y un organismo con la suficiente complejidad y fidelidad en los procesos de replicación, transcripción y traducción como para ser considerado un verdadero genote. Sin embargo, si se considera al último ancestro común como un organismo con genoma de DNA y un aparato de traducción de complejidad considerable, no quedan muchos argumentos para visualizarlo como un progenote; en todo caso, se trataría de un progenote muy avanzado (Lazcano et al., 1992).

Es fácil concluir que si el RNA precedió al DNA como material genético, las enzimas y los procesos involucrados en el metabolismo del RNA deben ser también de los más antiguos. En particular, una RNA replicasa debe de haber sido de las primeras enzimas en aparecer (Lazcano, 1986; Lazcano et al., 1988). Más aún, suponiendo que existió un periodo durante el cual la síntesis de proteínas ocurría en células con genomas de RNA (Alberts, 1986; Gilbert, 1986;

Lazcano, 1986), la diversidad y complejidad de las moléculas de RNA que intervienen en el proceso de traducción sugiere la existencia de un elaborado metabolismo del RNA, que permitiera su utilización óptima, mucho antes de la aparición del DNA.

Hoy en día, los mRNAs de E. coli, después de ser traducidos, son degradados gracias a dos enzimas diferentes: la RNasa II y la polinucleótido-fosforilasa (Natori y Mizuno, 1967; Natori et al., 1967; Donovan y Kushner, 1986). Esta última enzima, la polinucleótido-fosforilasa (PNPasa) (polirribonucleótido: ortofosfato nucleotidil transferasa, EC 2.7.7.8) fue descubierta en 1955 por Marianne Grunberg-Manago y Severo Ochoa (Grunberg-Manago y Ochoa, 1955). Es una enzima que cataliza la polimerización reversible de ribonucleósidos difosfatos con liberación de fosfato inorgánico. Un paso de la fosforólisis o polimerización puede representarse mediante la siguiente reacción reversible:



RpN = polirribonucleótido
 Pi = fosfato inorgánico
 R = cebader
 ppN = ribonucleósido difosfato

La actividad enzimática máxima se obtiene cuando RpN es un polirribonucleótido de por lo menos tres nucleótidos y con un grupo hidroxilo en el extremo 3', R un polirribonucleótido también con un hidroxilo en 3' (cebador), y ppN un ribonucleósido 5'-pirofosfato. Se requiere también un catión divalente y se ha visto que Mg^{++} y Mn^{++} son los óptimos (Godefroy-Colburn y Grunberg-Manago, 1972).

La polimerización puede ocurrir en presencia o en ausencia de un cebador. A diferencia de las RNA polimerasas, la PNPasa no requiere molde, ni tampoco lo puede copiar. La enzima también cataliza una reacción de intercambio entre el fosfato inorgánico libre y el fosfato β del nucleósido difosfato (Godefroy-Colburn y Grunberg-Manago, 1972).

La PNPasa se encuentra ampliamente distribuida entre las eubacterias (Godefroy-Colburn y Grunberg-Manago, 1972). Existen numerosos reportes de PNPasa en eucariontes. Sin embargo, en muchos casos las actividades detectadas podrían ser atribuidas a la acción combinada de otras enzimas (Smellie, 1963). La primera prueba inequívoca de la presencia de PNPasa en células eucariontes fue obtenida por Fitt y See (1970), en hepatocitos de cobayo. Sin embargo,

esta enzima no sintetizaba polirribonucleótidos. Poco después se demostró su existencia en hojas de tabaco (Brishammar y Juntti, 1974), y Khan y Fraenkel-Conrat (1985) encontraron una enzima similar en pepino. Por otra parte, Peterkin y Fitt (1971) reportaron la existencia de una PNPasa arqueobacteriana, en la especie halofílica Halobacterium cutirubrum; sin embargo, el peso que determinaron para esta enzima (Peterkin y Fitt, 1971; Louis et al 1971) es mas de 10 veces inferior al del resto de las PNPasas conocidas.

En efecto, en E. coli la enzima es un trímero de cadenas α , de peso molecular individual de alrededor de 86 000 Da, y de 252 000 Da para la enzima completa (Portier, 1975). Se ha reportado también la existencia de una forma alterna de PNPasa que contiene, además de las tres cadenas α , un número indeterminado de cadenas β , de 48 000 Da de peso molecular; la función de estas cadenas es desconocida, ya que la enzima es igualmente activa en su ausencia. La PNPasa de Micrococcus luteus es muy similar en peso y estructura a la de E. coli (Grunberg-Manago, 1989), lo que sugiere que, al menos entre las eubacterias, la PNPasa está muy conservada. Para las enzimas de tabaco y pepino se han reportado pesos

Tabla 1. Algunas PNPasas caracterizadas de Eubacterias, Eucariontes y Arqueobacterias.

Organismo	Localización celular	P. M. (KDa)	Subunidades (P. M. en KDa)	Catálisis	Referencias
<i>Escherichia coli</i>	Extractos solubles y ribosomas	Forma A: 252 Forma B: 365	3 α (P.M. 86 ± 5) 3 $\alpha + n \beta$ (P. M. 48 ± 2)	Fosforólisis, intercambio y polimerización	Godefroy-Colburn y Grunberg-Manago, 1972 Portier, 1975
<i>Micrococcus luteus</i>	Extractos solubles	220	3 (P. M. 80-70)	Fosforólisis, intercambio y polimerización	Klee, 1968
Cobayo (higado)	Probablemente núcleo			Fosforólisis e intercambio	Fitt y See, 1970
Tabaco (hojas)	Incierta	150		Fosforólisis, intercambio y polimerización	Brishammar y Juntti, 1974
Pepino (hojas y cotiledones)	Incierta	150	2 (P. M. 51.8) + 1 (P. M. 48.4)	Polimerización	Khan y Fraenkel-Conrat, 1985
<i>Halobacterium cutirubrum</i>	Membrana	11-12		Fosforólisis, intercambio y polimerización	Peterkin y Fitt, 1971

totales de 150 000 Da; se ha propuesto también que la enzima es un trímero de subunidades de peso alrededor de los 50 000 Da, pero que podrían ser distintas entre sí, ya que corren de manera diferencial en geles desnaturizantes de poliacrilamida (Khan y Fraenkel-Conrat, 1985). En cambio, Louis et al. (1971) reportan para la PNPasa de H. cutirubrum un peso de 11-12 000 Da, inferior en más de un orden de magnitud al de las enzimas de eubacterias o eucariontes.

Regnier et al. (1987) secuenciaron y mapearon el gen que codifica para la PNPasa en E. coli; el gen *pnp* se encuentra en un operón que incluye al gen *rpsO*, que codifica para la proteína ribosomal S15. Estos mismos autores reportan homología entre una región de 69 aminoácidos en la PNPasa y cuatro regiones homólogas de la proteína ribosomal S1 que conforman su sitio de unión al RNA. Además, Velasco et al. (1992) localizaron un dominio -DD- en la secuencia primaria reportada por Regnier et al. (1987); este dominio lo comparten las reverso-transcriptasas, las RNA replicasas, las RNA polimerasas y las PNPasas; las DNA polimerasas presentan un dominio similar, centrado en la secuencia -DTDS-. Puesto que la PNPasa es una enzima independiente de molde, la presencia en su secuencia de un dominio -DD-

sugiere que éste está involucrado en la unión a los sustratos nucleotídicos (Velasco et al., 1992).

La función de la PNPasa in vivo ha sido difícil de definir. Desde los años '60 se creía que probablemente la enzima no tuviera una función de síntesis, ya que las altas concentraciones de fosfato en el interior celular favorecen la reacción inversa, y además la enzima no lee molde alguno (Godefroy-colburn y Grunberg-Manago, 1972). De hecho, Natori et al. (1967) propusieron que la enzima está involucrada en el recambio de ribosomas en E. coli y en la degradación del mRNA después de la transcripción. Por otra parte, Geiduschek y Haselkorn (1969) sugirieron que el mRNA debe ser primero inactivado por una endonucleasa y posteriormente, los fragmentos deben ser degradados por la PNPasa y la RNasa II, ya que la polaridad de degradación de la PNPasa (3' a 5') es opuesta a las de transcripción, traducción y degradación del mRNA. La localización de la PNPasa en el núcleo de algunas células animales sugiere también su participación en la degradación del hnRNA (Harris, 1963).

En 1986 se demostró, mediante ensayos de complementación genética, que la PNPasa ejerce, efectivamente, la función

de degradación de mRNAs, la cual comparte con la RNasa II (Donovan y Kushner, 1986). Los resultados de este trabajo parecen indicar que no se requiere de la PNPasa para la degradación de tRNAs ni rRNAs.

Debido a la amplia distribución filogenética de la PNPasa, ésta podría haberse encontrado ya presente en el último ancestro común. De hecho, sus propiedades estructurales y funcionales apoyan esta idea. En comparación con las RNA polimerasas celulares, la PNPasa es una enzima pequeña (su tamaño en eubacterias, alrededor de 200 KDa, es inferior a la mitad del de la RNA polimerasa, de alrededor de 500 KDa) y de estructura simple. La síntesis de RNA que realiza in vitro es más sencilla, puesto que no utiliza molde. La PNPasa podría parecer una RNA polimerasa primitiva. Sin embargo, la PNPasa no funciona como enzima de síntesis en las células actuales, y probablemente nunca lo hizo. Por otra parte, no existen pruebas contundentes de que comparta un origen común con el resto de las polimerasas, ya que el dominio -DD- es tan corto que no se puede descartar la posibilidad de una convergencia (Lazcano et al., 1991; Velasco et al., 1992), y no existen evidencias de que se compartan secuencias adicionales de mayor tamaño.

Sin embargo, es obvio que la aparición de una enzima que permitiera un recambio eficiente de las moléculas de RNA sería muy ventajosa en una célula primitiva. En particular, la PNPasa no solo permitiría la degradación de los RNAs después de que estos hubieran cumplido su función, sino que, además, representaría un ahorro energético para la célula; en efecto, la reacción fosforolítica produce nuevos nucleósidos difosfatos, que pueden entonces ser reutilizados como tales, o bien, tras fosforilarse para formar NTPs, pueden ser nuevamente usados para la síntesis de polirribonucleótidos, disminuyendo así el requerimiento de síntesis de novo de ribonucleótidos y conservando la energía del enlace fosfato.

Por lo anterior, en este trabajo se buscaron evidencias de homología entre las PNPasas de una eubacteria (E. coli) y una arqueobacteria (H. halobium), para intentar probar la hipótesis de un origen común, es decir, de la presencia de la PNPasa en el último ancestro universal. Para detectar esta posible homología se realizaron pruebas de reconocimiento inmunológico cruzado, mediante un anticuerpo monoclonal desarrollado contra la enzima eubacteriana. Las pruebas inmunológicas, aunque no son tan determinantes en el reconocimiento de homologías entre proteínas como la

comparación de secuencias, son un método ampliamente usado y muy rico en información evolutiva. No está por demás recordar que la primera filogenia basada en el grado de similitud entre una misma molécula en diferentes organismos la realizó Morris Goodman en 1962, utilizando técnicas inmunológicas, a partir de las ideas sugeridas por Nuttall desde 1902. En el caso particular de las polimerasas, la eficiencia de los métodos inmunológicos fue ampliamente demostrada con el trabajo de Zillig et al (1985), que determinó la homología de distintas subunidades de RNA polimerasas de eubacterias, arqueobacterias y eucariontes.

II. HIPOTESIS

La PNPasa es probablemente una enzima antigua, que se encontraba presente en el último ancestro común a todos los seres vivos actuales. De haber sido así, las arqueobacterias deberían presentar PNPasas homólogas a las enzimas eubacterianas, probablemente con similitudes estructurales suficientes como para ser reconocidas por un mismo anticuerpo monoclonal. Es pues probable que un anticuerpo monoclonal dirigido contra la PNPasa de E. coli reconozca a la enzima de H. halobium, cuya existencia se predice.

III. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo fue buscar evidencias del origen monofilético de las PNPasas eubacterianas y arqueobacterianas, mediante pruebas de reconocimiento inmunológico cruzado. Para ello, se plantearon los siguientes puntos:

- establecer cultivos sólidos y líquidos de H. halobium;
- aislar la posible PNPasa de H. halobium, en estado semi-puro;
- detectar actividad de PNPasa en extractos de H. halobium; y

-realizar inmunodetecciones, mediante un anticuerpo monoclonal preparado contra la PNPasa de E. coli, para establecer si este reconoce o no a la posible PNPasa de H. halobium.

IV. MATERIALES Y METODOS

CULTIVO DE Halobacterium halobium

El medio de cultivo se utilizó de acuerdo a la "American Type Culture Collection", Maryland, ATCC 29341 (ver apéndice). Los cultivos de almacenamiento se mantuvieron en medio con 2% de agar en tubos con tapa de rosca. Se crecieron a 30°C de 2 a 3 semanas y se guardaron a 4°C.

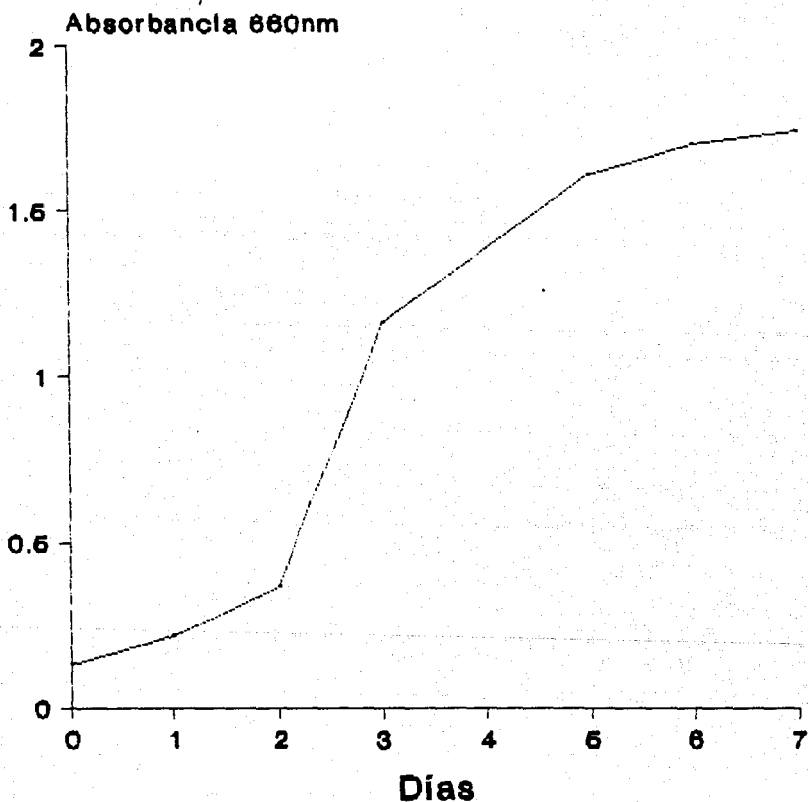


Fig. 1. Curva de crecimiento de *Halobacterium halobium* a 30 C, en medio de cultivo ATCC 29341, preparado con sal común.

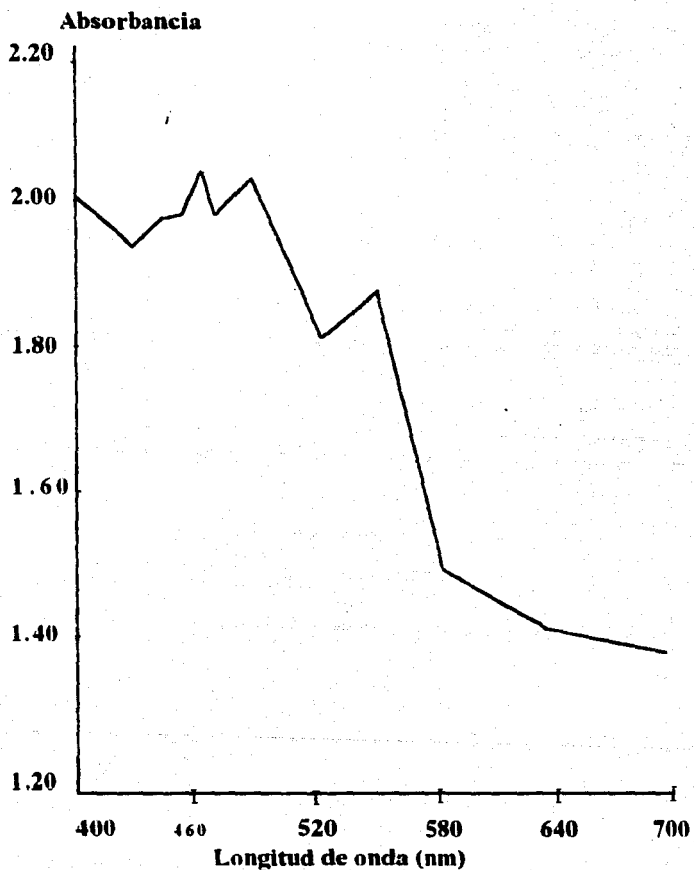


Fig. 2. Curva de absorción de los cultivos de *Halobacterium halobium* de 7 días. Los tres picos observados son característicos del carotenoide bacteriorrubrina (Stoeckenius, 1978).

A partir de los anteriores, se prepararon cultivos líquidos a gran escala, que se sembraron bajo condiciones estériles y se incubaron a 30°C con agitación vigorosa (250 rpm). La cosecha se llevó a cabo en fase estacionaria temprana por centrifugación a 5°C (6000 rpm). Después, se lavaron una vez en solución salina (medio de cultivo sin extracto de levadura y sin peptona) y se guardaron a -70°C. En las Fig. 1 y 2 se muestran la curva de crecimiento y el espectro de absorción de los pigmentos de H. halobium, respectivamente. Las mediciones de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro Beckman DU-50. En la Fig. 2, la velocidad de barrido fue de 500 nm/min; los tres picos observables son característicos de la bacteriorrubrina, carotenoide membranar de H. halobium.

AISLAMIENTO DE LA POLINUCLEOTIDO-FOSFORILASA

La posible PNPasa de H. halobium se aisló mediante el método descrito por Peterkin y Fitt (1971), pero deteniéndose antes de la purificación por filtración en Sephadex G-200.

El procedimiento se realizó a 0-5°C. Las células se resuspendieron en la solución amortiguadora A (2.5 M KCl-1 M NaCl-10 mM tris HCl, pH 8.5), y fueron sonicadas en porciones de 50 ml, en baño de hielo, durante 10 min con un desintegrador ultrasónico Branson con intensidad de 8, 50%. La mezcla se centrifugó a 27 000 g durante 20 min, para descartar las células restantes. Después de una segunda centrifugación de 1 h a 80 000 g, 84 ml de sobrenadante se dializaron en un tiempo de 2 h contra dos cambios de amortiguador 10 mM de Tris-HCl (pH 8.5, 1 l). A esta suspensión libre de sales se le adicionó sulfato de amonio y se colectó la fracción insoluble entre el 45% y el 85% de saturación; ésta se resuspendió y se dializó contra la solución A.

DETECCION DE LA PNPasa in situ

Se siguió el protocolo descrito por Thang et al. (1967) para E. coli, con las modificaciones que se describen a continuación. Se pesaron 0.5 g (peso húmedo) de células de H. halobium y se resuspendieron en 2 ml de solución amortiguadora A. Después de sonicar y centrifugar a 27 000 g por 20min, el extracto crudo obtenido se fraccionó en alícuotas de 250 µl. En ocasiones, el extracto fue previamente concentrado; para ello, se depositó en una bolsa

de diálisis, que se cubrió con polietilénlicol en polvo, y se mantuvo a 4°C de 30 min a 1 h.

A algunas alícuotas se les adicionaron 2 μ l de DNasa I (donación del Dr. Guarneros) y se dejó reaccionar durante 30 min a 4°C.

Se adicionó amortiguador de carga (5X) para DNA (azul de bromofenol 0.025%, glicerol 30%) a los extractos y las mezclas se corrieron en geles no desnaturizantes de poliacrilamida al 10%. Al final de la corrida los geles se incubaron a 37°C por al menos una noche en la mezcla de reacción siguiente: Tris-HCl 0.15 M, EDTA 0.4 mM, ADP 40 mM, MnCl₂ 5mM, MgCl₂ 5mM, KCl 1.25 M y NaCl 0.5 M. Inicialmente se probaron varios pHs para la reacción, adoptándose finalmente el ph 7.6 para todas las pruebas. Las concentraciones de los solutos se tomaron de un ensayo de actividad utilizado por Peterkin y Fitt (1971) para medir la incorporación de nucleósidos difosfatos marcados con C en una forma insoluble en ácido. En los controles negativos, los geles se incubaron en una mezcla que contenía los mismos solutos, a excepción del ADP.

Como control positivo se usó PNPasa de E. coli (Sigma), que se corrió en las mismas condiciones y se incubó en una

solución de, Tris-HCl 0.1 M, pH 8, MgCl₂ 0.01M, EDTA 0.1 mM, ADP 10mM.

Posteriormente, para revelar el polimero de AMP formado por la PNPasa, los geles se fijaron y se tiñeron con naranja de acridina 1%-ácido acético 7%, o con bromuro de etidio a una concentración final aproximada de 10ug/ml.

Las bandas reveladas por actividad fueron cortadas y molidas en un mortero con amortiguador de Laemmli (Tris 0.6 M, pH 6.8, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol mg/ml). Las mezclas así obtenidas se hirvieron durante 1 min y, tras adicionarles 2-mercaptoetanol a una concentración final de 5%, se corrieron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida-SDS (10%) y se transfirieron a nitrocelulosa para realizar la inmunodetección, como se describe a continuación.

ELECTROFORESIS E INMUNODETECCION

Las electroforesis en gel de poliacrilamida (10 %) con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) se realizaron siguiendo esencialmente el procedimiento descrito por Laemmli (1970).

Las electroforesis en geles nativos a una concentración de poliacrilamida de 7.5 %, se realizaron según Davis (1964), utilizando una cámara Mini-Cell de Bio Rad.

Las proteínas se transfirieron electroforéticamente a membranas de nitrocelulosa, por un periodo de 2h y a una intensidad aproximadamente constante de 0.7 A.

El patrón de bandas obtenido se tiñó con negro de amido. Los papeles de nitrocelulosa con las proteínas transferidas se incubaron con agitación constante, durante 1h a temperatura ambiente, en una solución de leche en polvo al 5% en PBS-Tween (KH₂PO₄ 1.5 mM, Na₂HPO₄ 8.1 mM, KCl 2.7 mM, NaCl 137 mM, Tween 0.05%). Se lavaron 7 veces con PBS-Tween y se incubaron con los medios o sueros correspondientes en las condiciones descritas líneas arriba. Los papeles fueron nuevamente lavados y se les aplicó anticuerpo peroxidado de chivo anti-raton, diluido 1:2 000 en PBS . Después de la incubación y los lavados previamente descritos, los complejos antígeno-anticuerpo-anticuerpo peroxidado fueron identificados por la reacción colorida con peróxido en presencia de 3-3diaminobenzidina en amortiguador de fosfatos, pH 7.4, por 15 min.

Los ensayos de cuantificación de proteínas se realizaron por el microensayo de Bio Rad (Bio Rad Protein Assay Kit I, # de catalogo 900-0001), o por el método de Bradford (1976).

ANTICUERPOS MONOCLONALES

Los anticuerpos monoclonales utilizados en este trabajo fueron elaborados en el Laboratorio del Dr. Manuel Hernandez, en la Unidad de Reactivos Inmunológicos y Anticuerpos Monoclonales del Departamento de Biología Celular del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV, IPN). Los anticuerpos monoclonales se prepararon contra la PNPasa de *E. coli*, obtenida de Sigma, mediante la técnica descrita por Andrew y Titus (1991).

V. RESULTADOS Y DISCUSION

En la Fig.3 se puede observar el patrón de bandas obtenido al correr en un gel de poliacrilamida-SDS al 10% la preparación de PNPasa de E. coli obtenida de Sigma. La PNPasa de E. coli es un trímero de cadenas α de peso molecular 86 000 \pm 5000, en ocasiones asociado a cadenas β (48 000 \pm 2000), de función desconocida (Portier, 1975). Soreq y Littauer (1987) determinaron mediante SDS-PAGE un peso similar de 84 000 \pm 5000 para la cadena α . El patrón obtenido nos indica que la enzima no se encuentra totalmente pura, ya que aparecen numerosas bandas, con pesos

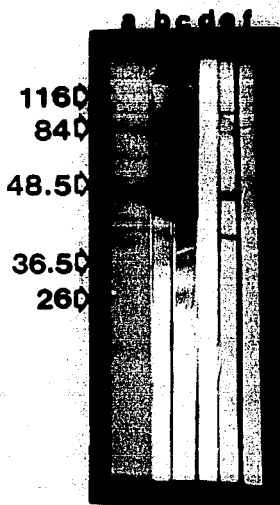
moleculares, que abarcan aproximadamente de 180 000 a 36 000, según los marcadores de alto y bajo peso molecular utilizados. Se puede identificar un grupo de varias bandas agrupadas alrededor de la marca de los 84 000 Da, que probablemente corresponden a formas ligeramente proteolizadas de la subunidad alfa de la PNPasa. También se observa una banda gruesa alrededor de los 48 000 Da, probablemente debida a la presencia de cadenas β , descritas por Portier (1975).

En la Fig. 4 se muestran los patrones de bandas reconocidos por los sueros inmunes, a partir de los cuales se seleccionó el anticuerpo monoclonal utilizado en este trabajo, así como el patrón reconocido por dicho anticuerpo. El monoclonal reconoce aún varias bandas, que corresponden al grupo de 84 000 Da (subunidad α), la banda de 48 000 Da (subunidad β) y una banda cercana a los 36 500 Da. Ello sugiere que el epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal no es exclusivo de la subunidad α , sino que ésta lo comparte con la subunidad β y otro péptido de naturaleza desconocida, que podría ser algún producto de proteólisis de cualquiera de las dos subunidades. El reconocimiento de ambas subunidades de la PNPasa por un mismo anticuerpo monoclonal implica que estas comparten características



Fig. 3. Patrón electroforético de la PNPasa semi-pura de *E. coli*. El análisis se realizó por SDS-PAGE (10%). El carril de la izquierda contenía 3 μ l de la preparación de *E. coli* obtenida de Sigma (6.8 μ g/ μ l). El carril de la derecha contenía una mezcla de los siguientes marcadores de peso molecular (KDa): 1, α 2 macroglobulina (180); 2, β galactosidasa (116); 3, fructosa-6-fosfato quinasa (84); 4, piruvato quinasa (58); 5, fumarasa (48.5); 6, deshidrogenasa láctica (36.5); 7, triosa-fosfato isomerasa (26).

Fig. 4. Patrón electroforético (a) e inmunodetecciones (b-f) de la PNPasa semi-pura de *E. coli* (Sigma). (b y c) Sueros inmunes a partir de los cuales se seleccionó el anticuerpo monoclonal. (d) Suero pre-inmune. (e) Anticuerpo monoclonal. (f) Medio de cultivo para hibridomas. Los pesos moleculares de algunos marcadores utilizados se indican en KDa.



estructurales y que los genes que las codifican pueden ser, al menos parcialmente, homólogos, aunque podrían estar incluso codificadas en el mismo gen.

Para detectar la PNPasa de H. halobium in situ, se probaron mezclas de reacción ajustadas a diferentes pH, cubriendo el rango reportado como óptimo por Peterkin y Fitt (1971). En la Fig. 5 se observan diferentes tiras de gel incubadas en la misma mezcla de reacción, pero a pH de 9.0, 8.6, 8.2 y 7.6, de izquierda a derecha. La última tira de gel es el control positivo de PNPasa de E. coli (Sigma), corrida en las mismas condiciones e incubada en las condiciones descritas por Thang (1967). Las tiras de gel fueron teñidas con naranja de acridina 1%-ácido acético 7%.

En las tiras b, c y d podemos observar en el extremo superior del gel, justo debajo de los respectivos pozos, una banda naranja, constituida por un material filamentososo que se desprende fácilmente. Ligeramente por debajo de ella, se ve una segunda banda teñida, más delgada. Además, existen ciertos restos coloridos en el fondo de los pozos que no pudieron penetrar al gel. El naranja de acridina se une selectivamente a los ácidos nucleicos, por lo que las bandas descritas podrían corresponder a polímeros de AMP

sintetizados por la PNPasa, o bien a ácidos nucleicos de alto peso molecular presentes en el extracto crudo. La escasa penetración de las bandas al gel y la poca diferencia existente con los controles negativos hicieron sospechar que se trataba de fragmentos de DNA cromosómico de H. halobium de alto peso molecular. Sin embargo, como veremos más adelante, existen varias evidencias que sugieren que se trata de polímeros sintetizados por la PNPasa.

Por un lado, no se observan bandas teñidas en la tira incubada a pH 9 y la intensidad y amplitud de las bandas aumenta ligeramente al disminuir el pH, hasta un máximo en 7.6 (Fig. 5), por lo que todos los ensayos posteriores se realizaron a este pH. La diferencia de resultado según el pH indica probablemente que lo que se está revelando es una actividad enzimática.

Para discernir si los resultados obtenidos eran significativos con respecto a los controles negativos, es decir, si las bandas observadas se pueden atribuir realmente a la síntesis de un polímero de AMP por la PNPasa a partir del ADP presente en el medio de reacción, se obtuvieron nuevos extractos crudos de H. halobium y se concentraron con polietilenglicol. Además, los geles se tiñeron con bromuro

de etidio, que es un colorante de mayor sensibilidad que el naranja de acridina para la detección de ácidos nucleicos. En la Fig. 6, se observan los resultados obtenidos por este procedimiento. La diferencia con los controles negativos (a la izquierda) es ahora notoria. Bajo luz ultravioleta, se observa una zona teñida en la parte superior del gel, que destaca a pesar de un fuerte fondo. En la fotografía se aprecia claramente que la banda si penetra al gel.

Para resolver el problema de la fuerte tinción del fondo y descartar la posibilidad de que las bandas observadas fueran DNA cromosómico, una alícuota de extracto crudo concentrado fue tratada con DNasa I previo al corrimiento de la electroforesis en gel no desnaturalizante. El resultado obtenido despues de la tinción con bromuro de etidio se observa en la Fig. 7. El fondo desaparece por completo, lo que demuestra que este era causado por un barrido de DNA de diferentes tamaños. En cambio, se observa una clara banda teñida, que no se encuentra en el control negativo (a la derecha) y que no puede corresponder mas que a un polímero de AMP sintetizado por la PNPasa de *H. halobium*. La banda es sin embargo más delgada y definida que la zona teñida que se observa en la parte superior del gel en la Fig. 6, por lo que probablemente ahí se encontraba también DNA de alto




Fig. 5. Detección in situ de la posible PNPasa de H. halobium. La electroforesis se realizó en geles nativos de poliacrilamida (10%). Los carriles a-d contenían 24 μ l de extracto crudo de H. halobium. Los pHs de los medios de incubación (descritos en Materiales y Métodos) fueron, de izquierda a derecha: 9, 8.6, 8.2 y 7.6. El carril e contenía 10 μ l (6.8 μ g/ μ l) de la preparación de PNPasa semi-pura de E. coli (Sigma). Los geles se tiñeron con naranja de acridina (1%).

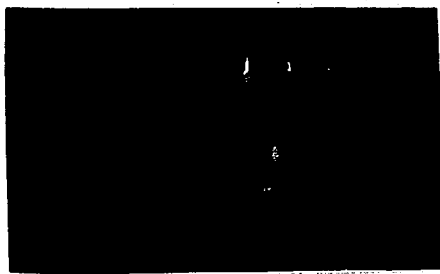


Fig. 6. Detección in situ de la posible PNPasa de H. halobium. Todos los carriles contenían 24 μ l de extracto crudo concentrado. El pH de los medios de incubación (descritos en Materiales y Métodos) fue de 7.6. El gel de la izquierda se incubó en ausencia de ADP. La tinción se realizó con bromuro de etidio (10 μ g/ml).

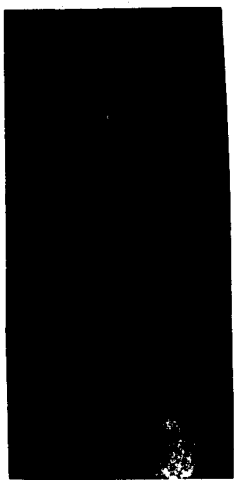


Fig. 7. Detección in situ de la posible PNPasa de H. halobium. Ambos carriles contenían 24 μ l de extracto crudo concentrado, tratado con DNasa I. El carril de la derecha se incubó en ausencia de ADP. La tinción se realizó con bromuro de etidio (10 μ g/ml).

peso molecular, además del producto de la actividad de la PNPasa.

Muestras de la fracción de extracto de H. halobium parcialmente purificada para enriquecerla en PNPasa, según el método de Peterkin y Fitt (1971), fueron corridas en geles no desnaturalizantes y transferidas a papel de nitrocelulosa. En la Fig. 8 se puede ver la inmunodetección obtenida con el anticuerpo monoclonal. La flecha señala el inicio del gel separador (7.5% de acrilamida). Inmediatamente por debajo se observa una banda reconocida por el monoclonal, seguida de otra más tenue. Estas bandas tienen una buena correspondencia con las obtenidas en los ensayos de actividad, que se muestran en las figuras anteriores. Además, se puede observar también una banda de proteína que permaneció en el gel concentrador (3.9% de acrilamida), y que puede corresponder al material que tampoco logró penetrar a los geles de los ensayos de actividad (10% de acrilamida). Por lo tanto, las bandas reveladas por actividad sí corresponden a la PNPasa y esta sí es reconocida por el anticuerpo monoclonal dirigido contra la enzima de E. coli.

La PNPasa de H. halobium tiene pues una movilidad escasa en geles nativos de poliacrilamida. Esto puede deberse a varios factores. Podría tratarse de una proteína de gran tamaño, o encontrarse en forma de agregados supramoleculares preservados por las condiciones electroforéticas no desnaturalizantes. Sin embargo, hay que hacer notar que tanto Peterkin y Fitt (1971) como Louis et al. (1971) reportan un peso molecular para la PNPasa de H. cutirubrum de 11 000-12 000. Los mismos autores demuestran que la PNPasa de H. cutirubrum se encuentra asociada a la membrana y es liberada durante la sonicación de las células, ya que la enzima que ellos aislaron se encuentra asociada a lípidos característicos de la membrana de esta arqueobacteria (Kates et al., 1966). Este hecho podría explicar la poca movilidad de la enzima, ya que es posible que ésta, por ser una proteína asociada a membrana, presente pocos residuos cargados. Además, las zonas teñidas en los geles de actividad siempre presentan, antes de la tinción y en los blancos, un color rojo debido sin duda a la bacteriorrubrina, carotenoide membranal de H. halobium.

Para confirmar que la PNPasa de H. halobium detectada por actividad es reconocida por el monoclonal, y para ganar alguna información sobre su composición en subunidades y su peso molecular, se cortó de los geles la zona teñida con

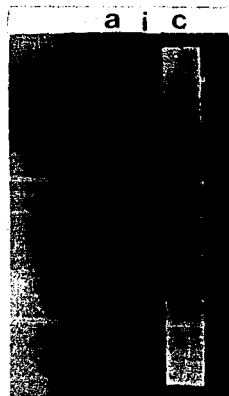
naranja de acridina o con bromuro de etidio. Esta se maceró en amortiguador de Laemmli y se corrió electroforéticamente en condiciones desnaturalizantes. Los péptidos obtenidos fueron después transferidos a nitrocelulosa para realizar la inmunodetección. En la Fig. 9, se presenta el patrón de péptidos teñidos con azul de Coomassie en el gel, así como los péptidos detectados mediante negro de amido sobre el papel y la correspondiente inmunodetección. En el gel se ven tres bandas relativamente cercanas pero bien diferenciadas, mientras que en el papel solo se observan dos de ellas, de pesos moleculares aproximados de 70 000 y 55 000 Da. La tercera banda (alrededor de 50 000 Da) no fue transferida de manera efectiva, o bien, no se detectó mediante negro de amido, menos sensible que el azul de Coomassie. En la inmunodetección, podemos observar que ambas bandas teñidas por el negro de amido son reconocidas por el anticuerpo monoclonal. La PNPasa de *H. halobium* está pues, aparentemente, formada por tres subunidades distintas, aunque también podría tratarse de diferentes estados de degradación de una misma cadena, ya que por lo menos dos de ellas son reconocidas por el mismo anticuerpo monoclonal; sobre el tercer péptido no se puede concluir nada, ya que el hecho de que no sea evidenciada ni por el negro de amido, ni por la inmunodetección apoya la posibilidad de que no se

haya transferido efectivamente al papel de nitrocelulosa. Sea como fuere, la menor de las cadenas detectadas tiene un peso molecular de aproximadamente 55 000 Da, muy superior al peso reportado por Peterkin y Fitt (1971) para la enzima completa. Además, tanto por la poca movilidad de la enzima en geles nativos, como por los antecedentes de peso molecular elevado y estructura trimerica de las PNPasas de eubacterias (Portier 1975) y eucariontes (Khan y Fraenkel-Conrat 95), es posible suponer que el complejo activo de la enzima este compuesto por varias subunidades, idénticas o no, y sea de elevado peso molecular.

Fig. 8. Extracto semi-puro de *H. halobium*, analizado en un gel nativo de poliacrilamida (7.5%), y transferido a papel de nitrocelulosa. (a) Patrón electroforético. (i) Inmunodetección mediante el anticuerpo monoclonal. La flecha indica el inicio del gel separador.



Fig. 9. Bandas detectadas por actividad, maceradas en amortiguador de Laemmli y analizadas por SDS-PAGE (10%). (a) Patrón electroforético en papel de nitrocelulosa, teñido con negro de anido. (i) Inmunodetección mediante el anticuerpo monoclonal. (c) Patrón electroforético en gel, teñido con azul de Coomassie. Las flechas indican las posiciones de los marcadores de peso molecular más próximos a las bandas obtenidas (kDa): (1) fructosa-6-fosfato quinasa (84), (2) piruvato quinasa (58) y (3) fumarasa (48.5).



CONCLUSIONES

En este trabajo hemos confirmado la existencia de una polinucleótido-fosforilasa en el género arqueobacteriano Halobacterium, previamente reportada por Peterkin y Fitt (1971) para *H. cutirubrum*. La PNPasa de H. halobium presenta actividad de polimerización de nucleósidos difosfatos, sin requerimiento de cebador para el extracto crudo, al igual que la PNPasa halobacteriana descrita previamente. En general, las polinucleótido-fosforilasas presentan tres tipos de acción, i.e., polimerización, fosforólisis e

intercambio, de fosfato. Mientras que algunos extractos enzimáticos presentan unicamente las actividades de polimerización e intercambio (Fitt y See, 1970), no se ha encontrado ninguna que sea unicamente sintetizadora (Khan y Fraenkel-Conrat, 1985). Siendo las tres actividades resultado de una única reacción reversible, favorecida en el sentido de la fosforólisis en el interior celular (Godefroy-Colburn y Grunberg-Manago, 1972) y siendo esta última función la que tiene importancia biológica (Grunberg-Manago, 1989), no dudamos que la PNPasa de H. halobium presente también las otras dos actividades.

Sin embargo, en este trabajo se pusieron de manifiesto ciertas diferencias con los datos reportados por Peterkin y Fitt (1971). Estos autores reportan el rango de pH 8.2-9.0 como el óptimo para la actividad polimerizadora de la PNPasa de H. cutirubrum. En cambio, en los presentes ensayos de síntesis iniciales (Fig. 3) no se encontro actividad a pH 9.0 y a pH 7.6 se observaron las bandas ligeramente más intensas y anchas, por lo que se adoptó este pH para los ensayos posteriores. Pero sobre todo, nuestros resultados indican que la PNPasa de H. halobium es un molécula de peso muy superior a los 11 000-12 000 Da reportados por Petetkin y Fitt (1971) y Louis et al (1971), lo que concuerda mejor

con los valores conocidos para todas las demás PNPasas de eubacterias y eucariontes. La posibilidad de que la misma molécula difiera tan considerablemente en peso entre dos especies de un mismo género es remota. Por lo tanto, tendemos a pensar que el peso reportado para H. cutirubrum es incorrecto.

Un anticuerpo monoclonal dirigido contra la PNPasa de E. coli reconoce tanto a la enzima no desnaturalizada de H. halobium, como a la(s) cadena(s) que la conforman. Esto significa que las PNPasas de organismos tan distantes filogenéticamente comparten por lo menos un epítotope, es decir, presentan cierta similitud estructural, lo cual es un reflejo de una similitud existente a nivel de secuencias génicas. Por lo tanto, el gen que codifica para la PNPasa de H. halobium debe presentar por lo menos un segmento similar y, por lo tanto, posiblemente homólogo, a algún segmento de la secuencia conocida de la subunidad α de la PNPasa de E. coli. El monoclonal utilizado no fue dirigido contra ninguna región en especial de ésta, como podría ser un sitio activo o un sitio de unión, con mayor probabilidad de conservarse a través de la evolución por las restricciones infligidas por su función. Sin embargo, el monoclonal se unió a la enzima de H. halobium; es improbable que el anticuerpo monoclonal

seleccionado haya resultado casualmente dirigido contra una zona especialmente conservada, por lo que probablemente el epítotope reconocido por el monoclonal utilizado no sea el único que comparten ambas enzimas; es decir, es probable que exista mas de un segmento homólogo entre ambos genes.

En todo caso, la reacción cruzada con el anticuerpo monoclonal indica que los genes que codifican para la PNPasa en una arqueobacteria, H. halobium, y una eubacteria, E. coli, poseen, al menos, algunas regiones que son homólogas. Esto significa que antes del primer evento de divergencia que separó a los ancestros de eubacterias y arqueobacterias (Gogarten et al., 1989; Iwabe et al., 1989; Lazcano et al., 1992), existió un gen ancestral a ambos genes actuales. Es pues razonable suponer que el último ancestro común a todas las formas de vida actuales presentaba ya un gen que codificaba para una enzima con actividad de PNPasa.

Aunque la PNPasa exhibe in vitro tres funciones diferentes, hoy se sabe que la función de esta enzima in vivo es degradativa, siendo responsable del recambio de los mRNA (Donovan y Kushner, 1986), participando así en la regulación de la traducción. Se han sugerido para la PNPasa otras funciones específicas de degradación de diferentes

tipos de RNA, como rRNA (Natori et al., 1967) o hnRNA en el núcleo de células animales (Harris, 1968). In vitro, la PNPasa puede degradar también tRNA (Thang et al., 1967b), aunque mucho más lentamente que otros polirribonucleótidos (Grunberg-Manago, 1963). Es pues posible que las funciones *in vivo* de esta enzima sean más amplias que el simple recambio de los mRNA.

En todo caso, el último ancestro común a los tres linajes monofiléticos actuales probablemente poseía ya una enzima capaz de degradar moléculas de RNA, lo cual permitía su recambio después de que hubieran cumplido con su función. Además, la reacción fosforolítica de la PNPasa produce nuevos nucleósidos difosfatos, que pueden ser reutilizados para cualquiera de sus funciones, o bien, tras la adición de un solo fosfato, formar NTPs y servir para la síntesis de nuevos polirribonucleótidos. Al conservar los monómeros intactos para su posterior reutilización, la PNPasa ahorra a la célula un enorme gasto energético en la síntesis *de novo* de ribonucleótidos. Además, a diferencia de las nucleasas, la PNPasa conserva la energía del enlace fosfato al liberar nucleósidos difosfatos en lugar de monofosfatos, por lo que disminuye aún más la demanda de energía durante el recambio del RNA (Godefroy-Colburn y Grunberg-Manago, 1972). Además

de permitir el reciclaje de los ribonucleótidos. la actividad degradadora de la PNPasa es en sí una forma de regulación sobre el evento de la traducción, porque ésta es determinante sobre la vida media de los mRNAs y, por lo tanto, sobre el número de moléculas de una proteína que se llegarán a producir. De una célula con un efectivo reciclaje de los RNAs y con la posibilidad de ejercer un control regulatorio a nivel de la traducción, no puede decirse que tuviera una relación imprecisa entre genotipo y fenotipo, es decir, no se le puede considerar un progenote. Por lo tanto, se concluye a partir de los datos aquí presentados que el último ancestro común puede ser considerado un verdadero genote, probablemente bastante parecido, en su nivel básico de organización, a los procariontes actuales. El origen de los primeros sistemas celulares debio haber ocurrido, pues, mucho antes de la separacion de aequeobacterias y eubacterias (Lazcano et al., 1992).

REFERENCIAS

Alberts, B. M. (1986). Am. Zool. 26: 781

Andrew, F. M., Titus, J. A. (1991). Common immunological techniques. En Current protocols in immunology, (ed.) Colligan, J. E., Kruisbeek, A. M., Margulies, D. H., Shevach, M., Strober, M. Greene Publishing y Wiley Interscience. New York.

Benner, S. A., Ellington, A. D., Tauer, A. (1989). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86:7054

Bradford, M. (1976). Analytical Biochemistry. 72: 248

Brishammar, S., Juntti, N. (1974). Arch. Biochem. Biophys. 164: 22

Carlson, J., Fuchs, J. A., Messing, J. (1984). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81: 4294

- Cech, T. R., (1987). Science. 236: 1532
- Crick, F. H. C. (1968). J. Mol. Evol. 38: 367
- Davis, B. J. (1964). Ann. N Y Acad. Sci. 121: 404
- Diaz, E. (1992). Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, U. N. A. M.
- Diener, T. O. (1982). Annu. Rev. Microbiol. 36: 239
- Donovan, W. P., Kushner, S. R. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83: 120
- Elledge, S. J., Davis, R. W. (1987). Mol. Cell. Biol. 7: 2783
- Ferris, J. P., Usher, D. A. (1983). Origins of life. En Biochemistry, ed. G. Zubay, p. 1191. Reading, Mass.: Addison-Wesley.
- Fitt, P. S., See, Y. P. (1970). Biochem J. 116: 309
- Forterre, P., Elie, C., Sloud, M., Hamal, A. (1989) Can. J. Microbiol. 35: 228
- Geiduschek, P., Hasekorn, R. (1969). Ann. Rev. Biochem. 38: 647
- Gilbert, W. (1986) Nature. 319: 618
- Godefroy-Colburn, T., Grunberg-Manago, M. (1972). Polynucleotide Phosphorylase. En The Enzymes. Vol. VII, p. 553, Academic Press, New York.
- Gogarten, J. P., Kibak, H., Dittrich, P., Taiz, L., Bowman, E. J., Bowman, B. J., Manolson, M. F., Poole, R. J., Date, T., Oshima, T., Konishi, J., Denda, K., Yoshida, M. (1989a) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86: 6661
- Gogarten, J. P., Rausch, T., Bernasconi, P., Kibak, H., Taiz, L. (1989b). Z. Naturforsch. 44c: 641
- Grunberg-Manago, M. (1963). Prog. Nucleic Acid Res. 1: 93
- Grunberg-Manago, M. (1989). Biochem. Biophys. Acta. 1000: 59

- Grunberg-Manago, M., Ochoa, S. (1955). J. Am. Chem. Soc. 77: 3165 ;
- Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N., Altman, S. (1983). Cell. 35: 849
- Harris, H. (1963). Proc. Roy. Soc. B158: 79
- Harris, H. (1968). Nucleus and Cytoplasm, p. 49. London: Oxford University Press.
- Hogenkamp, H. P. C., Follmann, H., Thauer, R. K. (1987). FEBS Lett. 219: 197
- Iwabe, N., Kuma, K., Hasegawa, M., Osawa, S., Miyata, T. (1989). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86: 9355
- Joyce, G. F. (1989a) Nature. 338: 217
- Joyce, G. F. (1989b) En Molecular Biology of RNA, (ed.) Cech, T. R. p. 361. Alan R. Liss, New York.
- Khan, Z., Fraenkel-Conrat, H. (1985). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 1311
- Kornberg, A. (1980). DNA Replication. San Francisco; Freeman, 724 pp.
- Kruger, K., Grabowsky, P. J., Zaug, A. J., Sands, D. E., Gottschling, D. E., Cech, T. R. (1982). Cell. 31: 147
- Laemmli, U. K. (1970). Nature (London). 227: 680
- Lammers, M., Follmann, H. (1983). Struct. Bonding. 54: 27
- Lazcano, A. (1986). Treballs Soc. Cat. Biol. 39: 73
- Lazcano, A., Fastag, J., Gariglio, P., Ramirez, C., Oro, J. (1988). J. Mol. Evol. 27: 365
- Lazcano, A., Guerrero, R., Margulis, L., Oro, J. (1988b). J. Mol. Evol. 27: 283
- Lazcano, A., LLaca, V., Fox, G. E., Oro, J. (1989). En Abstracts 6th ISSOL. Meet. y 9th Int. Conf. Origins of Life, Prague, p. 194

Lazcano, A., Valverde, V., Greco-Hernandez, Gariglio, P., Fox, G. E., Oro, J. (1992). J. Mol. Evol. (en prensa)

Lazcano, A., Fox, G. E., Oro, J. (1992) En The evolution of metabolic function, (ed.) Mortlock, R. P., p. 237. The Telford Press, Caldwell, N. J.

Lechner, K., Bock, A. (1987). Mol. Gen. Genet. 208: 523

Lechner, K., Heller, G., Bock, A. (1988). Nucleic Acid Res. 16: 7817

Lin, A. N. I., Ashley, G. W., Stubbe, J. (1987). Biochemistry. 26: 6905

Louis, B. G., Peterkin, P. I., Fitt, P. S. (1971). Biochem. J. 121: 635

Natori, S., Mizuno, D. (1967) Biochem. Biophys. Acta. 145: 328

Natori, S., Yogo, Y., Mizuno, D. (1967). Biochem. Biophys. Acta. 145: 621

Oro, J., Miller, S. L., Lazcano, A. (1990). Annu. Rev. Earth Planet. Sci. 18: 317

Peterkin, P. I., Fitt, P. S. (1971). Biochem. J. 121: 613

Portier, C. (1975). Eur. J. Biochem. 55: 573

Reaney, D. C. (1982). Annu. Rev. Microbiol. 36: 47

Regnier, P., Grunberg-Manago, M., Portier, C. (1987). J. Biol. Chem. 262: 63

Roy, P., Fukusho, A., Ritter, G. D., Lyon, D. (1988) Nucleic Acids Res. 16: 11, 759

See, Y. P., Fitt, P. S. (1970). Biochem. J. 119: 517

Slabaugh, M., Roseman, N., Davis, R., Mathews, C. (1988). J. Virol. 62: 519

Smellie, R. M. S. (1963). Prog. Nucleic Acid Res. 1: 27

Spirin, A. S. (1986). Ribosome Structure and Protein Biosynthesis. Menlo Park, Calif: Benjamin Cummings. 414 pp.

- Sprengel, G., Follmann, H. (1981). FEBS Lett. 132: 207
- Stanworth, D. R. (1960), Nature. 188: 156.
- Stoeckenius, W. (1978). En The Photosynthetic Bacteria. Cap. 29 (ed.) Clayton, R. K. y Sistrom, W. R. Plenum Press. New York
- Thang, M. N., Guschlbauer, W., Zachau, H. G., Grunberg-Manago, M. (1967). J. Mol. Biol. 26: 403
- Thang, M. N., Thang, D. C., Leautey, J. (1967). C. R. Acad. Sci. Paris. 265: 1823
- Velasco, A. M., Medrano, L., Lazcano, A., Oro, J. (1993). J. Mol. Evol. 36 (en prensa)
- Woese, C. R., Sogin, M., Stahl, D., Lewis, B. J., Bonen, L. (1976). J. Mol. Evol. 7: 197
- Woese, C. R. (1987). Microbiol. Rev. 51: 221
- Woese, C. R., Fox, G. E. (1977). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5088
- Zillig, W., Schnabel, R., Stetter, K. O. (1985). Curr. Topics Microbiol. Immunol. 114: 1
- Zuckerklund, E., Pauling, L. (1965). J. Theor. Biol. 8: 357