

302927

5
24.



UNIVERSIDAD FEMENINA DE MEXICO

Estabilidad de la RNA Polimerasa - DNA dependiente, de Organismos Eucariontes

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

Quimico Farmaceutico Biologo.

P R E S E N T A :

Maria Ericka del Rfo Mondragón

MEXICO / 1997

**TESIS CON
VALIA 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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

A MIS PADRES

**A TODOS MIS
COMPAÑEROS DEL
CINVESTAV**

El presente trabajo experimental se realizó en el departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del I.P.N.

CONTENIDO:

Lista de abreviaturas.

Lista de tablas.

Lista de figuras.

Antecedentes generales.

Antecedentes directos.

Objetivos generales.

Objetivos específicos.

Estrategia experimental.

Materiales.

Métodos.

Cultivo de células HeLa.

Cultivo de células CV1P.

Cultivo de células PK15.

Transferencia Western.

Marcaje con I-125.

Yodación de proteína A.

Preparación de las muestras.

Tratamiento de choque térmico (heat shock).

Resultados.

Estabilidad de la RNA polimerasa IIO, subunidad IIO.

Estabilidad de la RNA polimerasa IIO ante el choque térmico.

Morfología de los cultivos eucariontes después del choque térmico.

Discusión.

Conclusión.

Literatura citada.

Bibliografía sobre choque térmico (heat shock).

CONTENIDO:

Lista de abreviaturas.

Lista de tablas.

Lista de figuras.

Antecedentes generales.

Antecedentes directos.

Objetivos generales.

Objetivos específicos.

Estrategia experimental.

Materiales.

Métodos.

Cultivo de células HeLa.

Cultivo de células CV1P.

Cultivo de células PK15.

Transferencia Western.

Marcaje con I-125.

Yodación de proteína A.

Preparación de las muestras.

Tratamiento de choque térmico (heat shock).

Resultados.

Estabilidad de la RNA polimerasa IIO, subunidad IIO.

Estabilidad de la RNA polimerasa IIO ante el choque térmico.

Morfología de los cultivos eucariontes después del choque térmico.

Discusión.

Conclusión.

Literatura citada.

Bibliografía sobre choque térmico (heat shock).

Lista de Abreviaturas.

a.a	aminoácido.
ADN	ácido desoxirribonucleico.
AF	amortiguador de fosfatos (PBS)
AL	amortiguador de lavado (WB)
AM	amortiguador de muestra.
APS	persulfato de amonio.
ARN	ácido ribonucleico.
ARNm	ácido ribonucleico mensajero.
ARNt	ácido ribonucleico de transferencia.
ASB	albúmina sérica de bovino (BSA).
DTT	ditiotreitól.
DCT	dominio carboxi-terminal.
EDTA	etilendinitritotetracetato disódico.
EGPA	electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)
H ₂ O ₂	peróxido de hidrógeno
HRP	reactivo de raíz acoplada a la peroxidasa
I125	iodo 125
Ig	inmunoglobulina.
Kd	kilodalton.
MEM	medio mínimo esencial
mCi	millicuries.
βMe	beta mercaptanol.
Met S35	metionina-azufre 35
PMSF	fenil metil sulfonil fluoruro
SDS	dodecil sulfato de sodio
TEA	trietanolamina
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilendiamino
uV	ultravioleta
ul	microlitros.
UAS	secuencias activantes upstream.
UPE	elementos upstream.

LISTA DE FIGURAS:

- Figura 1. Fosforilación de la RNA polimerasa.
- Figura 2. Formación de los complejos DA y DB.
- Figura 3. Modelo de la asociación de la RNA polimerasa II con el promotor.
- Figura 4. Formación del complejo de preiniciación en promotores que contienen una caja TATA.
- Figura 5. Formación del complejo de preiniciación en promotores sin caja TATA.
- Figura 6. Dr es un represor basal de la transcripción.
- Figura 7. Cromatografía de la RNA polimerasa de timo de ternera.
- Figura 8. Subunidades de la RNA polimerasa IIO, IIA, y IIB .
- Figura 9. Modelo para la respuesta Choque Térmico.
- Figura 10. Inmunodetección de la enzima RNA polímerasa Ilo.
- Figura 11. Estabilidad de la enzima a 48horas a 4°C.
- Figura 12. Autoradiografía de la cinética de estabilización a 25°C.
- Figura 13. Autoradiografía de la cinética de estabilización a 37°C.
- Figura 14. Efecto del choque térmico sobre la estabilidad de la RNA polimerasa Ilo.
- Figura 15. Efecto del choque térmico sobre la RNA polimerasa en tiempos largos.
- Figura 16. Efecto del choque térmico sobre la RNA polimerasa con tiempos de recuperación.
- Figura 17. Efecto del tratamiento hipertérmico sobre el cultivo de células HeLa.
- Figura 18. Efecto del tratamiento hipertérmico sobre el cultivo de células CVIP.
- Figura 19. Efecto del tratamiento hipertérmico sobre el cultivo de células PK15.
- Figura 20. Cultivo de células HeLa con tiempo de recuperación.
- Figura 21. Cultivo de células CVIP con tiempo de recuperación.
- Figura 22. Cultivo de células PK15 con tiempo de recuperación.

LISTA DE TABLAS.

Tabla 1. Abreviaciones de los aminoácidos.

Tabla 2. Clases de factores de transcripción.

Tabla 3. Factores de transcripción.

Tabla 4. Reactividad relativa del anticuerpo.

Aminoácidos	Símbolo	
	1 letra	3 letras
Alanina	A	Ala
Arginina	R	Arg
Asparagina	N	Asn
Acido Aspártico	D	Asp
Cisteína	C	Cys
Glutamina	Q	Gln
Acido glutámico	E	Glu
Glicina	G	Gly
Histidina	H	His
Isoleucina	I	Ile
Leucina	L	Leu
Lisina	K	Lys
Metionina	M	Met
Fenilalanina	F	Phe
Prolina	P	Pro
Serina	S	Ser
Treonina	T	Thr
Triptofano	W	Trp
Tirosina	Y	Tyr
Valina	V	Val

Tabla 1. Abreviaciones o símbolos de los aminoácidos.

ANTECEDENTES GENERALES

La Transcripción es el proceso mediante el cual una hebra de DNA sirve como molde para la síntesis de una cadena de RNA y es un proceso que se basa en la complementariedad de las pares de bases. Esta catalizada por la enzima RNA polimerasa y consiste de tres pasos fundamentales: la iniciación que comienza cuando la RNA polimerasa se une al DNA, éste debe estar desenrollado y el desenrollamiento es un evento local que se inicia en el sitio en donde la polimerasa se une. La etapa de iniciación esta completa cuando es incorporado el primer nucleótido ; para que esta iniciación se lleve a cabo se necesita una secuencia de DNA a la que se le denomina Promotor y se encuentra antes del sitio de Iniciación , este sitio de comienzo o iniciación es en el cual se incorpora el primer nucleótido de la cadena de RNA. El segundo paso es la elongación y se describe como la fase durante la cual los nucleótidos son unidos covalentemente al extremo 3' de la cadena , las bases son adicionadas a la cadena de RNA formando un híbrido de RNA-DNA en la región desenrollada . Esta elongación involucra el movimiento de la enzima RNA polimerasa a lo largo de cortos segmentos de DNA que son pasajeramente desenrollados. El último paso es el de Terminación en el cual existe un punto en donde las bases ya no son adicionadas. Para el término de la transcripción el complejo de transcripción debe separarse, el híbrido RNA-DNA es interrumpido y la enzima y la cadena de RNA son liberadas.

La iniciación de la transcripción es el punto crítico del control de la expresión de los genes , muchas veces el iniciar o no en un cierto promotor determina si el gene puede ser expresado. Algunos promotores pueden ser reconocidos por la RNA polimerasa por sí sola, en estos casos este tipo de promotores accesibles siempre empezaran un transcrito; la disponibilidad del promotor puede ser determinado por proteínas externas, las cuales pueden actuar bloqueando el acceso de la polimerasa o controlando la estructura de la región del genoma. Existen otros promotores que no son adecuados por ellos mismos para la transcripción, entonces necesitan de factores auxiliares para que la iniciación ocurra .Los factores adicionales actúan mediante el reconocimiento de secuencias de DNA que pueden estar cerca o coinciden parcialmente con la secuencia de DNA a la que se une la RNA polimerasa . La información para la función del promotor está dada directamente por la secuencia de DNA, es decir su estructura es la señal, además los promotores varían en sus afinidades hacia la RNA polimerasa, esto puede ser un factor importante para el control de la iniciación y más adelante la expresión del gene.

Las secuencias que se encuentran antes del punto de iniciación son llamadas ascendentes (upstream), aquellas que se encuentran después son llamadas descendentes (downstream) ,así la transcripción va de derecha (upstream) a la izquierda (downstream), las posiciones de las bases son numeradas en ambas direcciones a partir del punto de iniciación ,que tiene el valor de +1, los números se

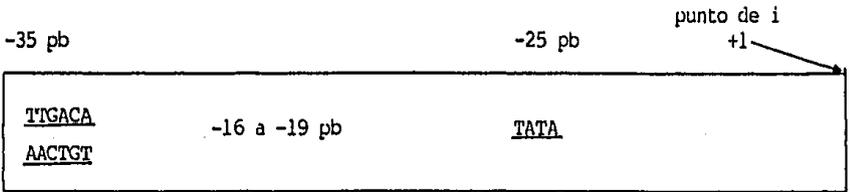
incrementan hacia la derecha (dirección downstream); la base que se encuentra antes del punto de inicio tienen el número de -1 y los números negativos se aumentan hacia la izquierda (dirección upstream). El producto inmediato de la transcripción es llamado el transcrito primario y consiste de un RNA que se extiende desde el promotor hasta el terminador pero es generalmente inestable y difícil de caracterizar in vivo y es modificado, en eucariotes, en los extremos con poliA para dar un RNA maduro (RNAm).

La mayoría de los promotores encontrados en mamíferos, pájaros, anfibios e insectos, tiene una secuencia TATA, la caja TATA, entre 19 y 27 pb upstream del punto de comienzo, la secuencia consenso consiste casi completamente de bases A-T, esta caja TATA tiende a ser rodeada de secuencias ricas en G-C y es casi idéntica a la caja TATA encontrada en promotores bacterianos pero su localización es distinta en lugar de estar a -10 está a -25.

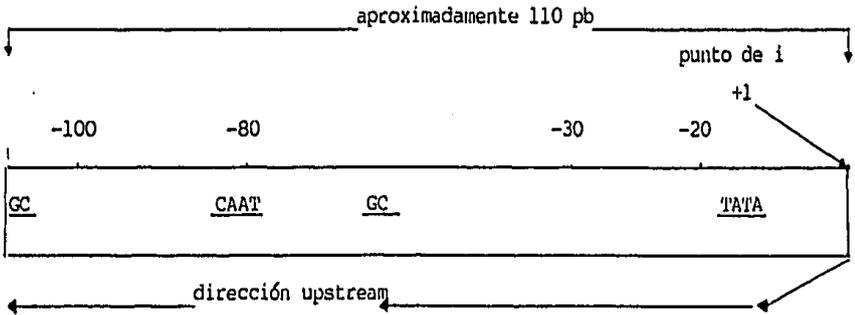
Algunas secuencias cortas han sido identificadas dentro de los promotores y algunos factores auxiliares se unen a ellas. Su localización es variable pero están aproximadamente 40pb upstream de la caja TATA. Es necesario hacer notar que la región que se encuentra alrededor de la caja TATA es necesaria para una iniciación precisa, además las dos regiones, la llamada región media localizada entre -50 y -70 y la llamada región distal localizada entre -80 y -110 son necesarias para una eficiente iniciación. Las regiones que se encuentran entre estas tres no están involucradas en la función del promotor, la distancia entre estos tres sitios suele ser moderadamente flexible; la separación entre los elementos que están más hacia la izquierda (dirección upstream) puede ser hasta de 15 pb después de este valor llega a ser inutilizable y su distancia de la caja TATA puede llegar a las 30pb, si sobrepasa la distancia el promotor es afectado. Los promotores in vivo parecen tener dos tipos de funciones: la frecuencia de la iniciación está influenciada por la función upstream que es dada por los elementos distal y medio, ambos tienen probablemente algún efecto para la unión de la polimerasa. La elección del punto de comienzo depende de la función cercana de un elemento que está muy cercano al punto de inicio y que se encuentra además alrededor de la caja TATA; al ser suprimido causa que el sitio de iniciación sea errático. El papel de esta secuencia podría ser el de alinear a la polimerasa para que así la iniciación sea en el sitio correcto.

Para explicar cómo un promotor que consiste de varios elementos funcionales separados puede unirse a la polimerasa cuyo tamaño no cubre la extensión de la distancia que ocupan estos elementos existen dos modelos; el primer modelo plantea a una RNA polimerasa que inicialmente contacta al sitio más alejado upstream y entonces se mueve hacia el sitio donde se encuentra el punto de inicio. El otro modelo nos hace recordar que el DNA in vivo no es lineal, su compacta organización podría crear sitios de yuxtaposición separados en la molécula duplex y los sitios de unión de la polimerasa aunque no sean contiguos son doblados sobre la molécula por proteínas que los acercan a la polimerasa. Podemos decir que el promotor contienen diferentes módulos y que cada uno tiene una función diferente, la función de cada módulo está determinado por una secuencia consenso corta, aunque la secuencia que rodea a este núcleo

Promotor Procarionte.



Promotor Eucarionte.



Anexo. La mayoría de los promotores encontrados en mamíferos, pájaros, anfibios e insectos tienen una secuencia TATA, la caja TATA, entre 19 y 27 pb upstream del punto de inicio (punto de i.) la secuencia consenso consiste casi completamente de bases AT, esta caja tiende a ser rodeada de secuencias ricas en GC y es casi idéntica a la caja TATA encontrada en promotores bacterianos pero su localización es distinta en lugar de estar a -10 esta a -25.

puede influenciar su efectividad y las secuencias consenso son llamadas todas "cajas" así como la caja TATA. La caja CAAT es encontrada en promotores de los genes de beta-globina y en el de TK (timidina cinasa del gen del virus del herpes), y está conservada casi en todos los promotores, la secuencia consenso es: GGC (o T) CAATCT. Otro elemento conservado es la caja GC la cual contiene la secuencia GGGCGG, que se presenta en muchas copias y puede estar en ambas orientaciones. Ubicando las regiones en el promotor, empezando en dirección upstream a partir del punto de inicio tenemos la región cercana en donde se encuentra la caja TATA, la región media contiene a la caja GC y en la región alejada se encuentra la caja CAAT y una segunda caja GC, las dos cajas GC tienen una orientación opuesta, y la caja CAAT se encuentra en orientación opuesta a la usual y pueden funcionar en ambas orientaciones.

Los factores de transcripción reconocen secuencias consenso particulares.

Las proteínas que son parte del aparato transcripcional (proteínas que son necesarias para iniciar la transcripción) pueden ser divididas en tres grupos: Las subunidades de la RNA polimerasa II son necesarias para todas las etapas de la transcripción, pero no son específicas para promotores individuales. Los factores de transcripción se pueden unir a la polimerasa cuando ésta forma un complejo de iniciación aunque no sean parte de la enzima libre, estos factores son necesarios para la iniciación de la transcripción en todos los promotores. Los factores de transcripción se unen a secuencias específicas en los promotores blanco.

Los extractos celulares totales (Manley y cols 1980) y citoplasmáticos o S-100 (Weil y cols. 1979) se han fraccionado para tratar de purificar los factores involucrados en el proceso de transcripción. Matsui y cols. (1980) al fraccionar el extracto S-100 por cromatografía, identifica 4 componentes (IIA, IIB, IIC y IID) que son requeridos para la iniciación precisa de la transcripción del promotor tardío de adenovirus-2. Más tarde, Samuels y cols. (1982), realizan un fraccionamiento análogo al descrito por Matsui, pero con el extracto celular total (Manley) encontrando que se requieren tres fracciones (AB, CB y DB) para la transcripción precisa. Por otra parte Dynan y Tjian (1983 a) al utilizar un método nuevo de fraccionamiento, y partiendo de un extracto total de células HeLa encuentran tres componentes que son necesarios para la iniciación de la transcripción: 1) un componente al que se denomina Sp1, que es específico para la transcripción del promotor temprano y tardío de SV40, 2) el segundo componente llamado Sp2 es un factor general, que es necesario para la transcripción de otros promotores y 3) el tercero corresponde a la fracción que contienen a la RNA polimerasa II endógena. Recientemente se ha logrado una mayor purificación de los factores involucrados en la iniciación específica de la transcripción y en algunos casos se ha caracterizado parcialmente su función. Por ensayos de reconstitución, se ha logrado identificar al menos cinco factores necesarios para la iniciación de la transcripción, dirigida por el promotor tardío de adenovirus. Basados en la nomenclatura utilizada por Reinberg y cols. (1987) estos factores son TFIIA, TFIIIB, TFIIID, TFIIIE, y TFIIF

FORMACION DE DEDO DE ZINC	DOMINIO DE LEUCINA	HELICE_HORQUILLA HELICE
GAL4(levadura)	GCN4(levadura)	ASC T4(drosophi.
SW 15(levadura)	YAP1(levadura)	ASC T5("
ADRI (levadura)	HBPI(planta)	Twist ("
Kruppel(Drosophila)	TGAI(planta)	c myc(verte.)
Hunchback(drosophila)	Opaco2(planta)	N myc(")
RHE	Fos(vert.)	Myo D (")
RT	Jun(vert.)	
Spl(vertebrados)	C/EBP(vert.)	
	CREB(vert.)	

Tabla 2 . Clases de factores de transcripción.

Ejemplos de diferentes clases de supuestos factores de transcripción divididos en tres tipos importantes de proteínas. Otras clases de factores existen que no quedan dentro de esta clasificación,

(Tomado de Gene structure and transcripción. RNA polymerase IIB and general transcription factors, Annu.Rev.Biochem. 59,711. 1990 Sawadogo and Sentenac)

TFIIA ha sido purificado parcialmente de células HeLa y tiene un peso molecular de aproximadamente 82 kd. El factor AB (Samuels y cols 19986) y el STF (Egly y cols. 1984) tienen características similares al factor TFIIA. El factor STF ha sido purificado de células HeLa y de timo de ternera, tiene un peso molecular aproximado de 34 kd. y se propone que puede ser la proteína actina ya que los anticuerpos anti-actina reaccionan con el factor citado. TFIIA y TFIID forman parte del complejo de iniciación. TFIIB tienen características similares a los factores CB1, BTF3 y alfa, es un factor que ha sido parcialmente purificado, y tiene un peso de 28 kd. La proteína forma un complejo con TFIIE (conteniendo TFIIF) el cual es requerido para los estadios finales de la formación del complejo de preiniciación. TFIID es conocido también como DB y BTF1 y tiene un peso molecular de 120 a 140 kd ha sido parcialmente purificado de células HeLa. Se une a la región de la caja TATA y junto con TFIIA forman un complejo, el cual es aparentemente necesario en el periodo inicial de la formación del complejo de preiniciación. Los ensayos de protección con TFIID y DNasa, muestran una región protegida de -40 a +35 pb en el promotor tardío de adenovirus y de -35 a -19 en el promotor de la proteína pcht (proteína choque térmico) 70 de humanos; Saltzman y Weinmann (1989) sugieren que probablemente existan diversas formas de TFIID o bien que TFIID interactúa de manera diferencial con los diferentes promotores. TFIIE es similar a CBII y BTFII y tienen un peso molecular de 60 kd, dicho factor está involucrado en la fase tardía de la formación del complejo de preiniciación. TFIIF es probablemente similar a BTF y está compuesto de dos proteínas de 30 y 82 kd. La actividad de TFIIF se encuentra en un complejo de 70-90 kd, y participa en la formación del complejo de preiniciación en su etapa tardía; asimismo, se ha encontrado que TFIIF contienen una proteína denominada RAP 30 la cual aparentemente interactúa con la RNA polimerasa II. Los cinco factores mencionados anteriormente interactúan junto con la RNA polimerasa II y forman un complejo de preiniciación (Saltzman y Weinmann 1989).

TFIIS o SII es un factor involucrado en la elongación de cadenas de RNA, con peso molecular de 38-42 kd ha sido purificado de tumores ascíticos de ratón y de timo de ternera; es capaz de estimular la transcripción no específica por RNA polimerasa II purificada. La proteína SII cosedimenta con la RNA polimerasa II cuando se analiza en gradiente de glicerol, lo cual sugiere que existen interacciones proteína-proteína implicadas en la estimulación transcripcional. Por estudios de cinética se ha encontrado que el factor IIS afecta la eficiencia con la cual la RNA polimerasa atraviesa regiones específicas de pausa, es por ello que la función que se le atribuye a este factor es la de interactuar con el complejo de iniciación y sobrepasar los sitios de pausa de la transcripción (Rappaport y cols. 1988; Reinberg y Roeder 1987). Además del factor antes mencionado, se requiere de la actividad de la RNasa H y topoisomerasa para el crecimiento de las cadenas. Estas enzimas son necesarias para remover segmentos de RNA no alineados, unidos al DNA, que impiden que las dos cadenas de DNA se reasocian nuevamente y la burbuja de transcripción continúe avanzando. También se ha encontrado por ensayos de transcripción *in vitro* e *in vivo* que la iniciación y elongación de cadenas de RNA ocurre en presencia de nucleosomas (Beard y cols. 1982).

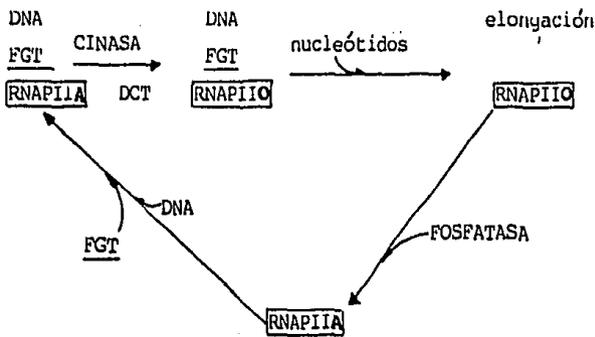


Fig.1. La fosforilación de la RNA polimerasa II modula la transición del inicio de la transcripción a la elongación. La forma IIA de la polimerasa se asocia con el complejo de preiniciación. Una o más proteínas cinasas comienzan la fase de elongación por medio de la fosforilación del DCT. La acción de una fosfatasa hace comenzar el ciclo. FGT factores generales de transcripción. DCT dominio carboxiterminal. (Tomado de Zawel y Reinberg, 1993).

Cuando múltiples factores se unen, sus interacciones con el promotor pueden ser de cooperatividad, es decir, que la unión de un factor puede ayudar a otro para unirse también y debemos pensar que sus interacciones en el promotor hacen posible una estructura tridimensional que junto con la RNA polimerasa constituyan el complejo de iniciación. Existen factores que son necesarios para la transcripción en general como los anteriores y hay otros que regulan la transcripción de algunos grupos de genes en particular y tenemos como ejemplo a los genes de la respuesta al choque térmico o heat shock.

La respuesta choque térmico es común en una gran variedad de eucariontes y procariontes e involucra muchos controles en cuanto a la expresión de los genes: un incremento en la temperatura apaga la transcripción de algunos genes y prende la transcripción de los genes choque térmico, y puede causar algunos cambios en la traducción de RNAsm. Los genes *cht* de los eucariotes poseen una secuencia consenso de 15pb corriente arriba del punto de inicio, el factor de transcripción *cht* (HSTF) está activo sólo en células que han sido tratadas con choque térmico, este factor se une a un sitio que está dentro de la secuencia consenso de choque térmico; la activación de este factor por consiguiente proporciona un medio de iniciar la transcripción en el grupo específico de genes que contengan la secuencia blanco apropiada en su promotor.

Los factores de transcripción eucarióticos pueden tener una amplia variedad de especificidades, los más comunes son probablemente aquellos necesarios para el reconocimiento de todos los promotores que contengan cajas TATA. Los menos comunes podrían ser los factores empleados para prender la transcripción de pequeños grupos de genes que están especializados en la respuesta a algunas señales específicas. Así los factores van de componentes muy comunes del aparato transcripcional a proteínas regulatorias poco comunes.

Un gene puede ser regulado por una secuencia en el promotor que es reconocida por una proteína específica, la proteína funciona como un factor de transcripción necesario para que la RNA polimerasa lo reconozca y se una y comience su función; este factor sólo está disponible cuando el gene va a ser expresado, su ausencia asegura que el promotor no va a ser usado.

Cuando un promotor está regulado en más de una manera, cada evento regulador puede depender de su unión a su propia proteína a alguna secuencia en particular. Por ejemplo, uno de los genes *cht* en *Drosophila* es expresado en dos circunstancias: en todos los tejidos cuando se eleva la temperatura, y en los ovarios a temperatura normal; análisis por delección muestra que las secuencias de -49 a -85 son necesarias para la iniciación durante el choque térmico, mientras que las secuencias upstream de -341 son necesarias para la expresión en el ovario. Los promotores eucarióticos no suelen actuar solos, en algunos casos la actividad de un promotor es incrementada por la presencia de otra secuencia conocida como aumentador o activador (enhancer); un activador se distingue de un promotor por dos características: su posición no es fija y puede funcionar en ambas orientaciones, no está restringido para auxiliar a un promotor en particular, pero puede estimular a cualquier promotor que esté en su vecindad. El aumentador de SV40 está localizado en una región

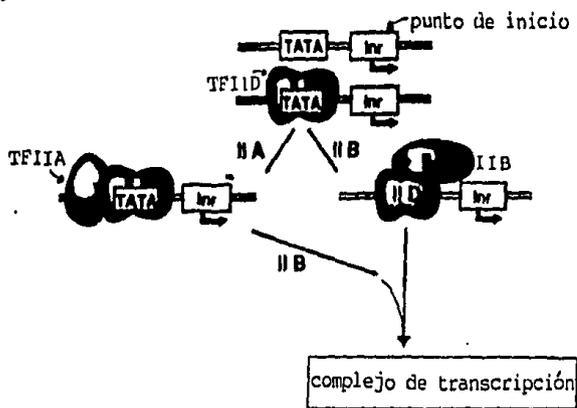


Fig.2. Formación de los complejos TFIID-TFIIA TFIID-TFIIB.
 TFIID reconoce y se une a la caja TATA, este es el primer factor
 que se asocia al promotor.
 (Tomado de Zawel y Reinberg. 1993).

del genoma que contiene dos secuencias idénticas de 72 pb repetidas en tandem aproximadamente 200 pb upstream del punto de iniciación de la unidad transcripcional; estas repeticiones de las 72 pb se encuentran en una región que tiene una estructura inusual de nucleoproteína, aparentemente es una estructura que está más expuesta que las demás. El mapeo por supresión muestra que una de estas repeticiones es adecuada para soportar la transcripción normal, pero la supresión de ambas repeticiones reduce de manera notable la transcripción in vivo. Este activador tiene una característica muy peculiar, por experimentos de reconstrucción en los cuales la secuencia de 72 pb es removida del DNA e insertada en cualquier otro lugar muestran que la transcripción normal puede llevarse a cabo si el activador se presenta en cualquier lugar y a distintas distancias del promotor; si el gene de la beta-globina se coloca en una molécula de DNA que contiene una repetición de 72 pb, su transcripción se ve incrementada in vivo más de 200 veces y esto ocurre aún a pesar de que la secuencia se encuentra a más de -1400 pb (upstream) o a +3300 pb (downstream) del punto de inicio. La secuencia puede ser invertida y reemplazada y aún bajo estas condiciones sigue funcionando.

Los aumentadores pueden tener estructuras modulares; el activador de SV40 puede ser separado en dos mitades que son activas cuando son separadas por cierta distancia. Los análisis mutacionales identifica tres dominios: la mutación de cualquier dominio inactiva al activador, pero puede ser revertida duplicando cualquiera de los dos dominios restantes. Aunque los dominios son diferentes en secuencia, parece ser que juegan papeles similares, ya que un aumentador activo puede ser creado por la combinación de un número suficiente de dominios de tipo silvestre.

Los modelos que explican cómo los activadores pueden estimular la iniciación y estar en cualquier lado y a cualquier distancia, son: un aumentador podría cambiar la estructura en conjunto del templado - por ejemplo, por medio de la influencia de la proteína-DNA en la organización de la cromatina, o cambiando la densidad del superenrollado. Contra esta idea están los resultados que demuestran que los activadores continúan la función bajo condiciones en que el superenrollamiento no puede ser propagado a lo largo de la doble hélice. Todos los aumentadores caracterizados incluyen un intervalo de residuos alternados de pirimidina-purina, con una forma parecida a la de Z-DNA; una posibilidad es que los activadores funcionen formando un Z-DNA de corta longitud, un efecto estructural de esta naturaleza explicaría porqué el aumentador puede afectar a un promotor estando en cualquier lado.

Si un activador da un sitio de fijación, podría ser responsable de la localización del templado en algún lugar en particular dentro de la célula, por ejemplo, fijándola a una matriz nuclear.

Un aumentador podría suministrar un sitio de entrada bidireccional, un punto en el cual la RNA polimerasa II se asocia con la cromatina.

Existen elementos similares a los activadores, llamados secuencias activadoras de corriente arriba (upstream activator sequences UAS) pueden funcionar en cualquier orientación, a distancias variables corriente arriba

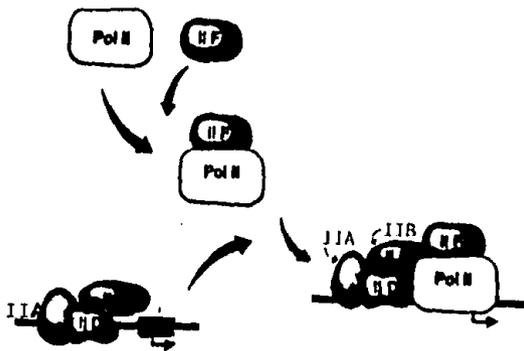


Fig.3. Modelo de la asociacion de la RNA polimerasa II en conjunto con TFIIF, reconoce el complejo DAB o el DB-DNA generando las asociaciones o complejos DAB-PolF o DB-PolF.

(Tomado de Zawel y Reinberg. 1993).

del promotor , pero no pueden funcionar cuando están en posiciones corriente abajo, tienen un papel regulador. Las UAS están unidas por proteínas reguladoras que activan a los genes. Si un sitio ligado por otra proteína o una secuencia que causa la transcripción hasta su término es introducida entre las UAS y el promotor del gene, el efecto activador es abolido. Este hecho puede concordar con el modelo de rastreo en el cual algunas proteínas, tal vez la RNA polimerasa II , físicamente se mueve al promotor de una manera sensible a bloques físicos (hechos por otras proteínas) o a señales reguladoras (para terminar el desplazamiento).

El campo de la investigación floreció hace ya 13 años cuando los procesos de transcripción fueron duplicados primeramente en sistemas libres de células reconstituidos con extractos celulares crudos (Well y cols. 1979). En el trabajo de Zawel y Reinberg (1993) y en sistemas subsecuentemente desarrollados llegó a ser muy claro que la precisa transcripción de la RNA polimerasa II es completamente dependiente de la presencia de un promotor (Manley y cols. 1980). Ha llegado a ser claro que las secuencias del templado de DNA actúa como señal que dirige a los factores de transcripción y a la RNA polimerasa al sitio de iniciación. Cuatro clases de elementos cis han sido identificados en los promotores en los genes de clase dos. La caja TATA y la región iniciadora (Inr) constituyen los primeros elementos de esta clase y son considerados como los elementos mínimos de un promotor uno o ambos parecen estar presentes en todos los genes codificadores y cada uno es independientemente capaz de dirigir la formación de un complejo competente de transcripción. La RNA polimerasa y los factores generales de transcripción colectivamente conocidos como la maquinaria básica de la transcripción funciona sobre estos elementos mínimos del promotor. Las otras dos clases, elementos de secuencias consenso (los cuales son reconocidos y unidos mediante proteínas unidoras específicas del DNA) y activadores, son considerados elementos variables, ya que su presencia o ausencia y el orden particular de su arreglo es específico del gene. La combinación de todos estos elementos cis le dan al promotor su fuerza característica.

La subunidad más grande de la RNA polimerasa II contienen un inusual dominio carboxi-terminal (DCT) que consiste de múltiples repeticiones de la secuencia consenso tyr-ser-pro-lhr-ser-pro-ser . Tal dominio no está presente en la RNA polimerasa procariontica o en la RNA Polimerasa I o III de eucariontes. La longitud de la repetición parecer estar correlacionada con la complejidad genómica del organismo. Debido al alto contenido de residuos de treonina y serina en el heptapéptido, el DCT puede ser altamente fosforilado como resultado de esta fosforilación la subunidad más grande de la RNA polimerasa II puede ser resuelta en dos formas mayores en geles de poli(acrilamida) SDS, la forma llamada IIO tiene la más baja movilidad de 240 Kd y contiene al DCT en su forma fosforilada. La forma IIA de 215 Kd, no fosforilada, y probablemente un producto primario de traducción in vivo. Una tercera forma IIB de 180 Kd carece completamente de el DCT y se piensa que es un artefacto proteolítico de purificación.

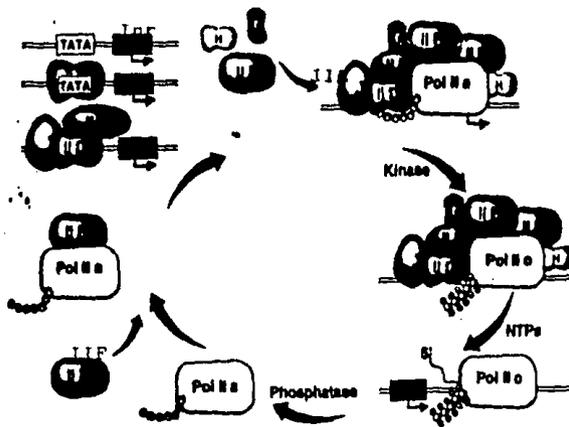


Fig.4. Formación del complejo de preiniciación en promotores que contienen una caja TATA. El modelo esquematiza el orden del ensamblaje de los FGT y la transición de la iniciación a la elongación es mediada por la cinasa DCT. Este modelo indica que la forma no fosforilada IIA de la polimerasa se asocia con el complejo de preiniciación. La acción de la cinasa es un evento que activa al complejo. (Tomado de Zavel y Reinberg.1993)

Una posible función para el DCT podría ser la mediación de la activación de la transcripción por medio de reguladores corriente arriba; en colaboración con Y. Aloni (del Instituto Weizmann) Zewel y Reinberg (Zewel y Reinberg 1993) han demostrado que el DCT específicamente interactúa con TFIID (Usheva y cols. 1992). Alternativamente otros han demostrado que el DCT es innecesario para el factor Sp1 (Zehring y Greenleaf 1990) en experimentos de activación in vitro. Tal vez el DCT es un mediador para la estimulación de solo un subgrupo de activadores, o solo en el contexto de un subgrupo de promotores específicos; existen datos (de Zewel y Reinberg así como de Farnham, artículo no publicado) que indican que el requerimiento para el DCT en transcripción basal puede ser determinado por el promotor utilizado, y más específicamente por la clase de bloque iniciador que este presente. Otro punto de vista sostiene que el DCT puede actuar para remover o para superar los efectos de los factores que regulan negativamente la transcripción (Peterson y cols. 1991); hay evidencia física que sugiere que el DCT puede intercalarse con el DNA de manera no específica (Suzuki 1990) tal actividad podría fortalecer la unión de la RNA polimerasa II y/o la estabilidad del complejo de iniciación, tal vez la fosforilación del DCT libera la interacción DCT / DNA, facilitando así la transición de la iniciación a la elongación (Corden 1990). Dahmus y Laybourn (1990) encontraron que: (1) la forma no fosforilada IIA establemente se asocia con el complejo de preiniciación, (2) la forma IIO puede ser aislada de los complejos de elongación, y (3) la conversión de RNA pol IIA a RNA pol IIO ocurre antes de la formación de la primera unión fosfodiéster.

Recientes investigaciones se han propuesto identificar la proteína celular cinasa que modifica el DCT. Dahmus y Laybourn (1990) propusieron que la cinasa DCT podría ser uno de los factores generales de transcripción presentes en el complejo de preiniciación. Fué recientemente encontrado que el factor TFIIH contiene una actividad cinasa DCT, actividad que es drásticamente estimulada por factores que dirigen a la polimerasa al factor TFIIH hacia el promotor.

Siete son los factores, llamados factores generales de transcripción (FGT), que han sido caracterizados, de estos siete factores solo uno, TFIID, contienen actividad de unión con el DNA con especificidad por la caja TATA. Los otros factores y la RNA polimerasa entran al ciclo de transcripción por interacciones proteína-proteína.

TFIID. Los análisis que se han hecho sobre este factor desde 1984 (Davison y cols. 1983, Fire y cols. 1984, Reinberg y cols. 1987) y en 1988 con el descubrimiento de que el factor TFIID de levadura podía reemplazar al TFIID de humano y soportar niveles basales de transcripción (Cavallini y cols. 1988, Buratowski y cols. 1988) guiaron a establecer las siguientes características de este factor: 1) La región conservada C-terminal de TFIID contiene una repetición de 78 aminoácidos que proveen a la molécula de un elemento de simetría. Esto puede ser importante en el reconocimiento de una caja TATA sin orientación. El área entre estas repeticiones podría estar involucrada en el contacto con TFIIA (Buratowski y Zhou 1992). 2) Un núcleo básico central con una abundancia de lisinas (120-156); esta región tiene el potencial para formar una α -hélice con

FACTORES HASTA 1989	FACTORES HASTA 1993	PROPIEDADES
TFIID	TFIID	abundancia de Lys
TFIIB	TFIIB	homología con sigma.
TFIIF	TFIIF	bloque de 76 a.a.
TFIIE	TFIIE	RAP30 y RAP 74.
		es esencial para la
		transcripción exac-
		ta, heterodímero de
		34 y 56 Kd.
	TFIIH	actividad cinasa.
TFIIA	TFIIA	contiene a TFIIJ.
	TFIIJ	reconoce y se aso-
		cia sólo con el
		complejo DBPolFEN.

Tabla 3. Factores de Transcripción.

todos los residuos básicos orientados en un lado, sugiriendo una unión al DNA o bien un papel de interacción proteína-proteína. 3) Una homología al factor sigma (197-240); esta región soporta una secuencia similar a la porción del factor sigma que interactúa directamente con el elemento -10 de los promotores bacterianos. El N-terminal no está conservado en las diferentes especies: 1) la característica más notable es la porción de 38 glutaminas consecutivas que se encuentran en la parte central de este dominio en humanos. 2) Un tripéptido Pro- Met- Thr es repetido 5 veces en humanos y cuatro veces en *Drosophila* (está ausente en levaduras) que se encuentra cerca de la unión o empalme entre el dominio amino-terminal y el núcleo básico. Los análisis mutacionales demuestran que en levaduras, *Drosophila* y clonas humanas, el dominio C-terminal altamente conservado es suficiente para proveer la unión del DNA a la caja TATA y actividad basal transcripcional (Horikoshi y cols. 1980, Peterson y cols. 1990, Hoey y cols. 1990). Apparently esta porción de la proteína es suficiente para la formación de un complejo activo de transcripción. Zhou y cols (Zhou y cols. 1991) han demostrado que: 1) el dominio carboxy-terminal del TFIID de levaduras es suficiente para la viabilidad de la célula pero que 2) una región ácido del amino-terminal es requerida para una respuesta transcripcional para la estimulación corriente arriba del factor y el crecimiento normal de la célula. El TFIID humano es parte de un gran complejo de proteína (Reinberg y cols. 1987). La sedimentación por gradiente de glicerol y el análisis por inmunoprecipitación indican que TFIID existe en la célula como un complejo multiprotéico con al menos seis polipéptidos con masas de 32 a 150 Kd (Dymlach y cols. 1991). En el ensamblaje inicial del complejo, la unión de TFIID a la caja TATA parece ser el primer paso, el complejo TFIID-DNA provee el sitio de reconocimiento para la asociación de otros factores generales de transcripción (FGT) y la RNA polimerasa II (Buratowski y cols. 1989, Maldonado y cols. 1990). La proteína unida a TATA (PUT) parece tener la habilidad de interactuar con muchos factores, dos factores que llevan a cabo la transcripción basal, TFIIA y TFIIB probablemente interactúan con el dominio conservado de TFIID.

TFIIB. Este factor tiene una masa molecular de 33Kd, la secuencia de nucleótidos de el TFIIB humano pronostica un marco abierto de lectura que codifica a un polipéptido de 316 aminoácidos con una masa molecular calculada de 34.8 Kd. Análisis para RNA en gel y de transferencia para proteínas indican que un solo gene humano codifica para TFIIB; este factor tiene un bloque repetido de 76 aminoácidos en el carboxi-terminal en la mitad de la proteína, estas repeticiones son requeridas por TFIIB para asociarse con el complejo TFIID-TFIIA (complejo DA) (Ha y cols. observaciones no publicadas), en los 20 aminoácidos que separan a este bloque de repeticiones, existe una región que sostiene una cierta familiaridad al factor sigma de procariones; también empalmado entre estos bloques de repeticiones se encuentra un dominio de 15 aminoácidos con un potencial para formar una α hélice que contiene los residuos hidrofóbicos a lo largo de un lado y residuos básicos cargados a lo largo del otro.

TFIIF. Cuando Greenblatt y sus colaboradores fraccionaron extractos derivados de timo de ternera o de células HeLa en columnas que contenían RNA polimerasa II inmovilizada, aislaron tres proteínas asociadas a la RNA

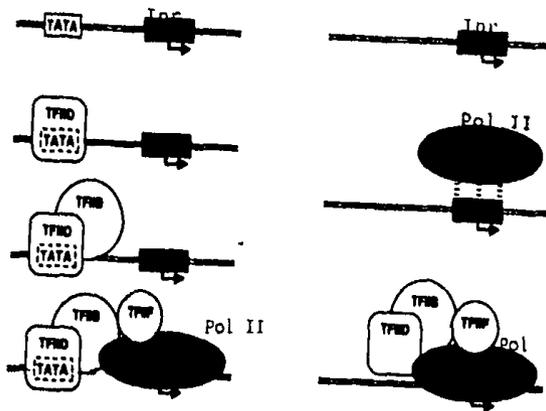


Fig.5. Formación del complejo de iniciación en promotores sin caja TATA. A la derecha un promotor sin caja TATA, a la izquierda un promotor con caja TATA. A la derecha la polimerasa se une débilmente al iniciador (Inr) y esta unión provee un sitio de anclaje para los otros FGT. (Tomado de Zawel y Reinberg, 1993).

polimerasa II: RAP30, RAP74 y RAP38 (Sopla y cols. 1985). RAP 38 es equivalente a TFIIIS, también conocida como SII, un factor de elongación que afecta la eficiencia a la cual RNA polimerasa II pasa a través de los sitios de pausa (Sekimizu y cols. 1979, Reinberg y Roeder 1987, Rappaport y cols. 1987). TFIIIF fue purificado a homogeneidad de extractos nucleares usando un ensayo funcional de transcripción, y los polipéptidos 30 y 74 Kd fueron inmunológicamente idénticos a RAP30 y RAP74 (Flores y cols. 1988, Flores y cols 1990). TFIIIF tiene una aparente masa molecular de 220 Kd, esto sugiere que existe en solución como una estructura $\alpha 2 \beta 2$ y además de ser esencial para la iniciación de la transcripción, TFIIIF tiene la habilidad de estimular la elongación (Bengal 1991). La secuencia de RAP30 es rica en residuos básicos y contienen varios bloques interesantes: 1) la porción central de RAP30 de 249 aminoácidos (residuos 93-165) es homóloga a las dos regiones no contiguas del factor sigma 70 de E. coli. 2) la porción amino terminal de la proteína (residuos 36-42) caracteriza un nucleótido consenso en un bloque de unión. 3) la región carboxy-terminal tienen un dominio homólogo al factor sigma 70 (residuos 164-174). RAP30 y RAP74, ambas subunidades de TFIIIF son fosforilables y la subunidad más grande está extensivamente fosforilada in vivo. RAP74 contiene un dominio globular en el N-terminal, un dominio central altamente cargado que contiene grupos de residuos ácidos y básicos, y un dominio globular C-terminal el cual incluye dos bloques interesantes: el primero es una región débil de homología con un subdominio (región IV) presente en la RNA polimerasa I de levaduras y en otras polimerasas de eucariotes, la función de esta región es desconocida. El otro bloque es una región de homología a la unión en lazo de fosfato de la timidina kinasa. El factor TFIIIF parece tener un papel crítico de asociación con la RNA polimerasa II y entregando la enzima al ensamblaje del complejo de preiniciación sobre el DNA. Buratowski y cols. han propuesto que la RNA polimerasa puede asociarse directamente con el complejo DAB (Buratowski y cols. 1989), sin embargo, cuando factores altamente purificados o recombinados son usados, ni TFIIIF ni la RNA polimerasa II pueden unirse al complejo DAB solos (Flores y cols. 1991). La formación del complejo DB-polF o DAB-PolF proveen el fundamento para que se asocien los factores restantes requeridos para la transcripción basal TFIIIE, TFIIH, y TFIIJ.

TFIIIE. Este factor copurifica con TFIIIF y con TFIIH; la purificación eventual de TFIIIE resultó en las siguientes observaciones: 1) TFIIIE es esencial para la exacta transcripción in vitro de promotores de clase II; 2) la actividad copurifica como un heterodímero de 34 y 56Kd, y la estequiometría parece ser 1:1; 3) los análisis por filtración de gel indican que el factor parece existir en solución como un tetrámero, con una masa aparente de 200 Kd (Okhuma 1991, Inostroza y cols 1991). El ensamblaje de TFIIIE en el complejo de iniciación ocurre después de la asociación de RNA polimerasa II/IF con el complejo DAB (Inostroza y cols. 1991). Las secuencias de las dos subunidades de TFIIIE p 34 y p56 no están cercanamente relacionadas a ninguna otra proteína, en ambas subunidades, sin embargo, hay varios bloques que pueden dar algunas claves del funcionamiento de TFIIIE; la subunidad de 56 Kd es altamente ácida, mientras la subunidad de 34 Kd es altamente básica, y hay una extensión de residuos ácidos en la región correspondiente de p34. De acuerdo

con las observaciones se sugiere una interacción de TFII E con la polimerasa II y otros FGT, en el p56 hay una secuencia con un potencial para formar una α -hélice anfipática con un grupo de residuos básicos en una cara y los residuos hidrofóbicos en la otra. La p56 contienen un grupo de residuos de cisteína arreglados de acuerdo al siguiente patrón CX2CX21CX2C, patrones similares de dedos de zinc (zinc-fingers) han sido encontrados en proteínas de unión a ácidos nucleicos como la familia de receptores de hormonas y esteroides, Sp1 y otras. La subunidad p56 contienen una región con homología a la secuencia consenso presente en el lazo catalítico de varias cinasas, cinasa RAF1, cinasa Src etc., este bloque es especialmente similar al dominio común en la familia de proteínas quinasas C. Aunque la subunidad de 58Kd no tienen la secuencia consenso para la unión de nucleótidos, hay un bloque en p34 que es similar a la sitio de unión de nucleótidos presente en la proteína de resistencia a drogas (Chen y cols. 1986) ; existen estudios previos que sugieren que TFII E contiene una actividad de ATPasa (Sawadogo y Roeder 1984). La asociación de TFII E con el complejo de preiniciación requiere del complejo DAB-PolF, y da origen al complejo DAB-PolFE, esto provee el fundamento de la asociación de TFII H.

TFII H. Cuando las preparaciones de TFII F fueron purificadas por cromatografía de fenil-superoxe, una actividad previamente sin caracterizar y con nivel esencial basal de transcripción fue descubierta (Flores y cols. 1992). El perfil de elución de esta actividad llamado TFII H, es distinto de TFII F como se determinó por análisis de Western blot usando anticuerpos contra RAP30 y RAP74. El factor TFII H es requerido para la transcripción de algunos promotores de clase II, incluyendo los de Hsp 70, Ad-MLP y Ad-IVa2. El factor TFII H entran en el complejo de preiniciación después de TFII E y antes de TFII J. Recientemente se ha detectado una actividad kinasa asociada a TFII H que puede fosforilar el DCT de RNA polimerasa II (Lu y cols. en prensa 1992).

TFII A. Este factor ha sido uno de los más controvertidos, en un principio se pensó que era una proteína llamada actina pero en estudios recientes de Reinberg y cols (1987) se logró separar la actividad de TFII A de la actina. Subsecuentemente han sido descritas preparaciones de TFII A libres de actina. La masa de TFII A fué estimada en 84 Kd, más tarde usando cromatografía de afinidad a TFII D, el factor TFII A fué aislado como un heterotrímero de 34, 19 y 14 Kd (Cortes y cols. 1992) , en 1991 se reportó la actividad de TFII A de células HeLa que contenía un solo polipéptido de 38Kd , también se purificó TFII A de extractos de germen de trigo reportándose un solo polipéptido de 35 Kd. TFII A ha sido recientemente purificado como un heterodímero de 32 y 13.5Kd de *S. cerevisiae* (Ranish y Hahn 1991); Para complicar más el perfil de este factor, se ha reportado un factor TFII G como un factor específico esencial de iniciación que puede ser parcialmente reemplazado por TFII A (Sumimoto y cols. 1990), este factor TFII G es requerido en ausencia de TFII A y no fue reportada la composición de polipéptidos para TFII G. Cortes y cols. en 1992 encontraron que el factor TFII A puede ser separado en su actividad en dos diferentes TFII A y TFII J: TFII A está compuesto de tres polipéptidos de 34, 19 y 14 Kd. TFII G parece ser una combinación de TFII H y TFII J. En la formación de los complejos, TFII A se puede asociar con el complejo TFII D-DNA, además TFII A se puede asociar con todos los intermediarios del

complejo de preiniciación :DB,DB-PolF,DB-PolFE etc. Estas observaciones , junto con el descubrimiento de que TFIIA no es requerida para la transcripción cuando las proteínas de unión del aparato transcripcional son usadas en lugar del TFIID nativo, sugiriendo que la asociación de TFIIA con la región del promotor no es necesaria para la formación de un competente complejo de transcripción. TFIJ en la otra mano, es requerido (cuando las proteínas de unión son usadas) y es el último factor en entrar al complejo de preiniciación;el factor TFIJ reconoce y se asocia solo con el complejo DB-PolFEH, resultando en la formación del complejo DB-PolFEHJ.

Complejos de preiniciación y de iniciación. Siete diferentes factores proteicos , en adición a la RNA polimerasa II , operan vía el elemento TATA para modular la transcripción basal : IID,IIA,IIIB,IIIF,IIIE,IIH y IIJ.La transcripción es comenzada por el ensamblaje , sobre el DNA conteniendo el promotor, de todos los factores de una manera ordenada: TFIID es el primer FGT en asociarse al promotor ya que es único factor que posee actividad de unión al DNA., TFIIA se puede entonces asociar con el complejo D-DNA también como con los intermedios subsiguientes, la formación del complejo DA está caracterizado por un incremento en la región protegida del corte con DNase (TFIID protege una región de 20 nucleótidos alrededor de la caja TATA de -36 a -17), TFIIB se asocia con el complejo DA-DNA, resultando en la formación de un complejo DAB (Buralowski y cols. 1989,Maldonado y cols. 1990), la siguiente entrega al complejo promotor-DAB es por medio de TFIIF. Los estudios de Flores y cols.(1991) demuestran que la asociación de la RNA polimerasa II con el complejo de preiniciación es estrictamente dependiente de TFIIF. De acuerdo con el modelo propuesto por Dahmus (Payne y cols. 1989), la forma IIA (no fosforilada) de la RNA polimerasa II es más eficientemente incorporada en el ensamblaje del complejo que la forma IIO, forma fosforilada (Lu y cols 1991), la subsiguiente fosforilación del DCT es la llave en la transición de la iniciación a la elongación. El factor TFIIIE, seguido de TFIIF reconocen y se asocian con el complejo DAB-pol F formando el complejo DAB-PolFEH (Flores y cols.1992, Inostroza y cols. 1991), finalmente el factor TFIJ se une completando el ensamblaje del complejo de preiniciación de transcripción; es ya sabido que la hidrólisis de ATP entre los fosfatos beta y lambda es requerida para que ocurra el inicio exacto de la transcripción, esta hidrólisis parece ocurrir subsiguientemente de completarse el ensamblaje del complejo de iniciación pero antes de la formación del primer enlace fosfodiéster, el papel de la hidrólisis del ATP es desconocido pero las especulaciones populares incluyen: 1) para fosforilar uno o varios de los FGT para que el complejo sea activado, 2) para facilitar la conversión de la RNA polimerasa IIA a IIO y 3) para dar energía para la formación del primer enlace fosfodiéster. Los eventos que establecen el complejo abierto en donde el templado de DNA ha sido en parte desarrollado es pobremente entendido, después de que esto es establecido todo lo que se necesita para la transcripción son los ribonucleósidos trifosfatos, si los nucleótidos están presentes el proceso por el cual el complejo activado comienza a moverse hacia abajo del DNA en el período de elongación, seguirá; se cree que algunos de los FGT permanecen en el promotor y son útiles para la reiniciación, mientras otros proceden a lo largo con el complejo de elongación.

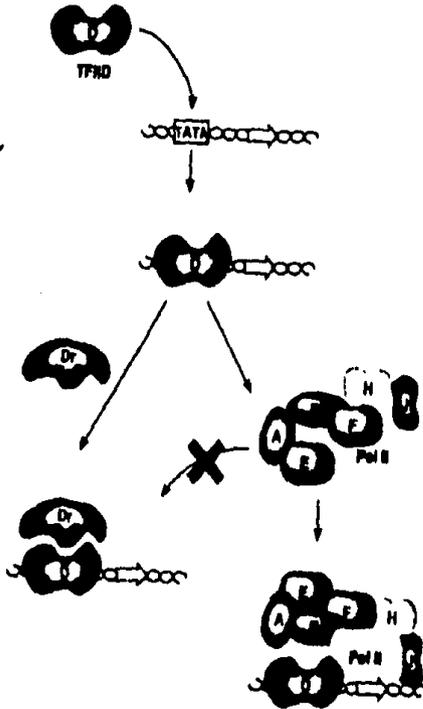


Fig. 6. Dr es un represor de la transcripción basal. Este modelo ilustra la habilidad de Dr para asociarse con TFIID, esta unión evita el ensamblaje posterior del complejo de pre-iniciación.

(Tomado de Zawel y Reinberg. 1993).

Existen promotores a los que les falta la caja TATA, los llamados genes de clase de mantenimiento (housekeeping), para conocer el mecanismo por el cual la señal para la iniciación es dada se hicieron algunos ensayos de deleciones sobre el promotor del gene de la deoxinucleotidiltransferasa y se demostró que existen alrededor del sitio de iniciación unos 17 nucleótidos que contienen la información necesaria para dirigir la iniciación de la transcripción, este elemento fue llamado el iniciador (Inr).

ANTECEDENTES DIRECTOS.

Los trabajos pioneros de Weiss, con núcleos de células de mamífero (Weiss 1959, Weiss y Gladstone 1960), mostraron por vez primera, la presencia de actividad de RNA polimerasa dependiente de DNA, en núcleos de hígado de rata.

La RNA polimerasa-DNA dependiente transcribe DNA a RNA usando los cuatro ribonucleótidos trifosfatos como sustratos. La reacción requiere un catión divalente, tal como el magnesio. El RNA es sintetizado en la dirección 5' a 3' y la secuencia resultante es complementaria en bases a la hebra del templado de DNA. Una molécula de pirofosfato es liberada para cada nucleótido incorporado en la cadena.

El núcleo eucariótico contiene tres distintas RNA polimerasas, las cuales difieren en su función: (Roeder R.G. 1976) La RNA polimerasa I sintetiza RNA ribosomales precursores. La RNA polimerasa II sintetiza RNA mensajeros precursores. La RNA polimerasa III transcribe genes de RNA de transferencia, 5S y RNAs nucleares pequeños.

La RNA polimerasa ha sido aislada de muchos tejidos eucarióticos aunque sólo unas pocas fuentes han rendido grandes cantidades de enzima pura. Levaduras, germen de trigo, y timo de ternera proveen los rendimientos más grandes de enzima.

La estructura de las subunidades de las RNA polimerasas eucarióticas es compleja. La electroforesis en geles de poliacrilamida SDS revelan entre nueve y catorce subunidades. Como es discutido por Paule (Paule 1981), las subunidades, pueden ser clasificadas como grandes (mayor de 100,000 daltones) o pequeñas (menos de 50,000 daltones). Una subunidad de tamaño intermedio es encontrada sólo en RNA polimerasa III. El polipéptido más grande es encontrado en la RNA polimerasa II (200,000-220,000).

El α -amanitina, un tóxico aislado del hongo *Amanita phalloides* (Wieland, 1964, 1968; Wieland & Wieland, 1972; Flume y cols. 1970) específicamente inhibe la síntesis de RNA catalizada a alta fuerza iónica en núcleos aislados (Stirpe & Flume 1967) la RNA polimerasa II es inhibida a bajas concentraciones de α -amanitina.

La α -amanitina inhibe todos los pasos de la reacción de la RNA polimerasa excepto la unión de la enzima con el DNA. La elongación de la cadena de RNA es inmediatamente parada cuando la α -amanitina es adicionada (Jacob y cols. 1970 a; Kedinger y cols. 1970; Lindell y cols. 1970). Ni el DNA ni el RNA son liberados del complejo de transcripción RNA-enzima-DNA (Mellhac y cols. 1974). Se desconoce a cual de las subunidades de la RNA polimerasa II la α -amanitina se une. Chambon y colaboradores (Kedinger, Nuret y Chambon 1971; Chambon y

cols.1974a; Chambon 1974,1975) han propuesto un sistema de nomenclatura basado en las sensibilidades a la α -amanitina de las RNA polimerasas. La clase A es sensitiva, la clase B es extremadamente sensitiva y la C es moderadamente sensitiva.

Los estudios estructurales y funcionales de los genes de la RNA polimerasa II de levadura y sus productos han revelado que las tres subunidades más grandes están relacionadas con las subunidades de RNA polimerasa procarionótica y son responsables de la catálisis del RNA. Las tres subunidades más pequeñas son componentes esenciales compartidos todos por las 3 RNA polimerasas nucleares. Dos de las subunidades pequeñas restantes forman un subcomplejo disociable que influencia la eficiencia de la iniciación de la transcripción *in vitro*.

Tres tipos de RNA polimerasa DNA dependientes son encontradas en los núcleos de todas las células eucarióticas, cada una responsable de la síntesis de diferentes clases de RNA. Roeder y Rutter (Roeder, Rutter 1969) primero separaron las tres enzimas de mamíferos por cromatografía DEAE- Sephadex y las llamaron I, II, III de acuerdo a su orden de elución mediante el incremento de las concentraciones de sulfato de amonio.

La RNA polimerasa II ha sido estudiada más extensamente que las otras RNA polimerasas nucleares, la cromatografía en columna ha sido usada para purificar la RNA polimerasa II a partir de un gran número de eucariotes, incluyendo : *Saccharomyces* (Sentenac 1985), *Neurospora* (Armaleo.&Gross 1985), *Acanthamoeba* (D'Alessio. y cols. 1979), *Dicystostelium* (Renart. y cols. 1985), *Physarum* (Smith.& Braun 1981), *Caenorhabditis* (Sanford. y cols. 1985), *Drosophila* (Greenleaf. Bautz 1975) *Xenopus* (Engelke. Shastri. Roeder 1983), limo de temera (Kim. Dahmus 1988), Humanos (Freund. McGuire 1986), y en una variedad de plantas (Jendrisak. y cols. 1976., Hodo. Blattl 1977). Las descripciones de los métodos estándar de purificación pueden ser encontradas en Sentenac (1985) y las modificaciones que efectivamente minimizan la proteólisis han sido reportadas (Kim. Dahmus 1988. 1986). Los métodos inmunológicos que han sido desarrollados recientemente permiten una rápida purificación de la enzima que es altamente activa en los ensayos de transcripción *in vitro* (Thompson. y cols. 1989).

Las múltiples formas cromatográficas y electroforéticas de la RNA polimerasa II son detectadas en preparaciones purificadas de la enzima. Estas formas difieren generalmente en la integridad del dominio carboxi-terminal y en la extensión en la que el DCT (Dominio carboxilo terminal) esta fosforilado (Allison. Moyle. Shales. Ingles 1985., Corden 1990).

Propiedades Generales.

La RNA polimerasa II purificada es capaz de llevar a cabo la síntesis de RNA dependiente de un molde de DNA en la ausencia de factores adicionales pero no es capaz de iniciar de manera selectiva en los promotores. La RNA polimerasa purificada puede ser dirigida para iniciar la transcripción en sitios

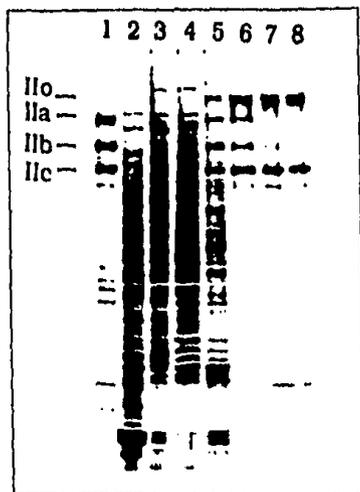


Fig.7. Cromatografía de la RNA polimerasa IIo de timo de ternera en varias etapas de purificación. Carril 1 marcador purificado por el método de Hodo y Blatti (1977), carril 2 RNA pol diluída con PEI, carril 3 pastilla disuelta en sulfato de amonio, carril 4 heparin- sepharose, carril 5,6,7 y 8 corresponden a fracciones tratados con DE52, DEAE-5PW, fenil- superosa y Mono Q respectivamente. (Tomado de Kim y Dahmus. 1988)

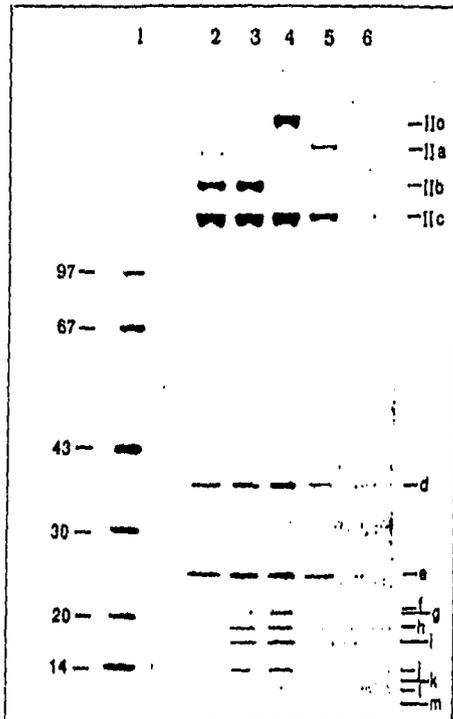


Fig.8. Subunidades de la RNA polimerasa IIO, IIA, y IIB
 Las subunidades fueron resueltas en gel de poliacrilamida SDS y el gel fue teñido con azul Coomassie. Carril 1 marcadores moleculares; fosforilasa b (97 000), albumina de suero de bovino (67000), ovoalbúmina (43000), anhidrasa carbónica (30000), inhibidor de soya de tripsina (20100) y alfa lactoalbúmina (14400). Carril 2 polimerasa purificada por el método de Hodo y Blatti (1977), carril 4 RNA pol IIO, carril 5 RNA pol IIA, carril 6 RNA pol IIB. Los números en el margen izquierdo indican pesos moleculares y las subunidades de la RNA pol están en el margen derecho. (tomado de Kim y Dahmus. 1988)

el templado del DNA (Yura y cols. 1979.,Chamberlin 1982.,Zillig y cols.1976). La subunidad más grande de la RNA polimerasa II eucariote también parece estar involucrada en la unión al DNA, como lo sugiere el entrecruzamiento con luz ultravioleta (Gundelfinger 1983., Chuang 1987). Varias características de la RPB3 (Proudfoot 1989) la tercera subunidad más grande de la polimerasa de levadura y la subunidad de 100 Kd de la polimerasa de E. coli sugieren que los dos polipéptidos pueden ser homólogos parciales, las dos subunidades son similares en tamaño (Kolodziej et.al. 1989 ., Ovchinnikov y cols. 1977) en secuencia (sobre una porción de la molécula) en estequimetría ya que ambos parecen existir en dos copias en la molécula de polimerasa y en sus aparentes papeles en el ensamblaje. RPB3 y alfa tienen 318 y 330 aminoácidos de longitud respectivamente, cuando las dos proteínas están alineadas hay un segmento de 25 aminoácidos (residuos 29-48 en RPB3 (Kolodziej y cols.1989)) en los cuales en 32% de los residuos son idénticos. La RPB3 y alfa juegan un papel primordial en el nucleado del ensamblaje de la enzima.

Aunque las tres subunidades grandes de la polimerasa II de eucariotes comparten muchas características con las tres subunidades-núcleo de procariontes, la RPB1 tiene una característica inusual que no es compartida con su homóloga procarionte, ésta contiene el dominio carboxy-terminal que consiste de múltiples repeticiones de la secuencia consenso: TYR-SER-PRO-THR-SER-PRO-SER (Allison y cols.1985., Corden 1990). El DCT es esencial para la viabilidad de la célula (Nonet y cols. 1987., Zehring y cols. 1988), está altamente fosforilado en una porción sustancial de las moléculas de la polimerasa II en la célula (Kim y cols. 1986., Kolodziej y cols. 1990) y parece estar involucrada en la respuesta a la activación de la transcripción de algunos promotores (Allison y cols. 1989.,Scafe y cols. 1990) .

Las subunidades comunes RPB5, RPB6 y RPB8.

Estas tres subunidades son componentes esenciales de todas las polimerasas nucleares (Woychik y cols. 1990) las proteínas RPB5, 6 y 8 con pesos moleculares aparentes deducidos de un SDS-PAGE de 27, 23 y 14.5 Kd (Sentenac 1985), llenan tamaños moleculares pronosticados a partir de la secuencia de genes de 25, 18 y 16 Kd respectivamente (Woychik y cols. 1990). La movilidad aberrante de la proteína RPB6 es aparentemente debida al hecho de que esta fosforilada (Kolodziej y cols.1990). Un papel en la unión al DNA ha sido sugerido para la RPB6 sin embargo la evidencia para esto es indirecta (Breant y cols. 1983., Huet y cols. 1985).

El subcomplejo RPB4/RPB7. Estas proteínas con pesos aparentes deducidos de SDS-PAGE de 32 y 16 Kd (Sentenac 1985) llenan tamaños moleculares pronosticados a partir de secuencias de genes de 25 y 18 Kd respectivamente (Woychik y cols. 1989). Estas dos proteínas parecen formar un subcomplejo dentro de la enzima que puede ser disociado a partir de una RNA polimerasa purificada bajo condiciones parciales de desnaturalización (Dezelee y cols.1976., Edwards y cols. 1991). Estas subunidades no son esenciales para la síntesis de RNAM in vivo, las células a las que les falta ya sea una ó dos de estas proteínas son viables a temperaturas moderadas. Este subcomplejo influye en la eficiencia de la iniciación de la transcripción selectiva.

específicos usando cebadores (primers) y la habilidad de la enzima para extender las terminaciones 3' de los cebadores ha sido aprovechada para investigar su elongación intrínseca y las propiedades de terminación (Sawadogo, Sentenac 1990). La RNA polimerasa II sola puede catalizar el alargamiento de la cadena de RNA. El promedio de la velocidad de alargamiento " in vitro" ha sido estimado ser entre 60 y 600 nucleótidos por minuto (Kadesh, Chamberlin 1982, Coulter, Greenleaf 1985). La velocidad de elongación puede ser influenciado significativamente por la pausa transcripcional (Sluder, Price, Greenleaf 1987). El pausado de la RNA polimerasa II parece estar involucrado en la terminación de la transcripción (Proudfoot 1989). Los factores adicionales pueden tener un papel en la regulación de la medida de la pausa, en la velocidad de la elongación y en la terminación.

Las Subunidades.

Las RNA polimerasas eucarióticas han sido tradicionalmente definidas como el juego de proteínas que copurifican, con la actividad transcripcional en ensayos de iniciación de la transcripción no específicos y la elongación con templates heterólogos. La RNA polimerasa procarióticas están compuestas de 3 subunidades en la núcleo enzima ($\beta\beta'$ α) y de un factor de especificidad (σ) ha sido definida por medio de la reconstitución a partir de subunidades purificadas y por análisis genético (Chamberlin 1976., Yura 1979., Chamberlin 1982).

La Arquitectura Molecular de la RNA polimerasa II.

Tres características de la RNA polimerasa II estan conservadas en eucariontes: primero, la RNA polimerasa II esta compuesta de 10-12 subunidades. Segundo, la enzima siempre contienen dos subunidades mayores con tamaños moleculares de aproximadamente 220 y 140 Kd. Finalmente, la polimerasa contiene tres subunidades de 14- 28 Kd que también se encuentran en las polimerasas I y III en los organismos eucariontes en donde la enzima ha sido estudiada. Estos polipéptidos son llamados subunidades comunes o compartidas.

Funciones y características de las subunidades.

Las tres subunidades más grandes son responsables de la catálisis del RNA, hay tres subunidades más pequeñas que son compartidas por las polimerasas I y III y dos pequeñas que forman un subcomplejo que tiende a disociarse de la enzima y puede tener un papel en la iniciación de la transcripción. Las dos subunidades más grandes de la polimerasa II, RPB1 y RPB2 están claramente relacionadas con las subunidades más grandes de la RNA polimerasa de E. coli. (Allison y cols. 1985., Sweetser y cols. 1987) Las dos subunidades grandes de procariotes y eucariontes son funcionalmente homólogas. Cada una puede contener porciones del sitio catalítico para la síntesis del RNA, la subunidad beta de E. coli puede unirse al DNA, sugiriendo que esta subunidad esta directamente involucrada en la interacción de la RNA polimerasa con

Subunidades de la RNA polimerasa II.

RPB9 /RPB11	RPB6	RPB4	RPB5	RPB1
RPB10	RPB8	RPB7	RPB3	RPB22

Nomenclatura Características de las subunidades de RNA pol II.

RPB1	Contiene el Dominio carboxiterminal.
RPB2	Contiene una porcion del sitio catalitico para la sinteis de RNA.
RPB3	100kd. Nucleado para el ensamblaje de la enzima.
RPB5	27kd.Se desconoce la funcion.
RPB6	23kd. Proteina fosforilada, juega un importante papel en la union con el promotor en el DNA.
RPB8	14.5kd.Se desconoce su funcion.
RPB4/RPB7	25 y 18kd respectivamente.Complejo que influencia la eficiencia de la iniciacion de la transcripcion selectiva.
RPB9	12kd.Esencial para el crecimiento de la celula a temperaturas extremas.Contiene 2 cassetes de cisteina que unen el Zinc.
RPB10	10kd. Se desconoce su funcion.
RPB11	12kd.Esencial para la viabilidad de la celula.

Las tres subunidades pequeñas RPB9, RPB10 y RPB11. La subunidad RPB9 tiene un peso molecular deducido de SDS-PAGE de 12 Kd (Sentenac 1985) y un tamaño molecular pronosticado de la secuencia del gen de 14 Kd, esta subunidad no es necesaria para la catálisis del RNAm pero es esencial para el crecimiento de la célula a temperaturas extremas y probablemente tenga algún papel en la eficiencia del inicio de la transcripción. La RPB9 es inusual entre las subunidades ya que contiene dos cassetes con repeticiones de cisteína los cuales pueden unir algo de Zinc que está asociado a la enzima (Lewis, Burgess 1982., Solaiman y cols. 1984., Lallke 1976).

La subunidad RPB10 tiene un peso molecular aparente deducido de SDS-PAGE de 10 KD (Sentenac 1985) y un tamaño molecular pronosticado de 5.4 Kd, esta subunidad es vital para la célula de levadura a pesar de que contribuye solo con 48 residuos de aminoácidos de una enzima que consiste de un total de 4329 residuos. La observación de que la banda en SDS-PAGE de 12.5 Kd puede ocasionalmente ser resuelta como un doblete, dió al descubrimiento de que RPB9 comigra con un segundo polipéptido y esta segunda subunidad fue designada RPB11 (Edwards y col.1990). La RPB11 tiene un peso molecular pronosticado por secuencia de gen de 14 Kd, la RPB11 es esencial para la célula de levadura viable, la RPB9 no.

El análisis de la subunidad más grande de una diversidad de eucariotes llevó al descubrimiento de un inusual dominio carboxy-terminal que consiste en una serie de repeticiones de la secuencia consenso Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser (Corden y cols. 1985, Allison y cols. 1985). Los análisis de mutaciones dentro de este dominio han establecido que un número mínimo de repeticiones son esenciales para las funciones "in vivo" de la célula (Nonet y cols. 1987, Allison y cols. 1988, Zehring y cols. 1988). Las células de mamíferos contienen dos formas de RNA polimerasa II, designadas IIO y IIA que difieren en la extensión de la fosforilación dentro del DCT (Kim y Dahmus 1986, Cadena y Dahmus 1987). La RNA polimerasa IIO está fuertemente fosforilada en relación con la forma IIA (Dahmus 1981, Cadena y Dahmus 1987). El marcado de fotoafinidad de la RNA polimerasa II en sistemas de transcripción de células libres, utilizando el promotor mayor tardío de adenovirus 2 (Bartholomew y cols. 1986) y núcleos aislados de células HeLa (Cadena y Dahmus 1987) indican que la elongación de la cadena está catalizada principalmente por la RNA polimerasa IIO. La conservación del DCT de la subunidad IIA de levaduras a mamíferos y los efectos letales de las mutaciones contenidas en el exón que codifica este dominio suministra una fuerte evidencia de que el DCT es necesario para la transcripción de genes esenciales para la célula; se ha propuesto que el DCT interactúa con otro componente del aparato transcripcional, por vía de interacciones proteína-proteína, para ayudar directamente y orientar a la RNA polimerasa II hacia el sitio de inicio de la transcripción (Corden y cols. 1985, Sigler 1988). Tales interacciones podrían ser mediadas en parte por la fosforilación del DCT (Cadena y Dahmus 1987). En el trabajo de de Laybourn y Dahmus (1989) se sugiere que la extensión de fosforilación del DCT cambia durante la transcripción y que la fosforilación del DCT puede estar involucrado en la transición de la enzima desde la iniciación hasta la elongación. De acuerdo a este modelo propuesto, la activación de la transcripción es

RNA POLIMERASA II	SUBUNIDAD	RADIO MOLAR	REACTIVIDAD RELATIVA DE ANTIC/mol subunidad
Timo de ternera	Ilo		
	IIa	0.30	1
	IIb	0.74	0.28
	IIc	1	
Célula HeLa	Ilo	0.30	3.2
	IIa	0.57	0.85
	IIb	0.09	
	IIc	1	

Tabla. 4 .Reactividad relativa del anticuerpo específico contra IIa de timo de ternera con las subunidades más grandes de la RNA polimerasa de timo de ternera y células HeLa.

(Tomado de Kim y Dahmus 1986. J. Biol. Chem. 261, 14219-14225.)

dependiente de la fosforilación del DCT de la subunidad IIA, consecuentemente, la proteína cinasa que cataliza esta conversión (de IIA a IIO) podría ser un factor de transcripción esencial.

Las tres subespecies de RNA polimerasa II, designadas IIO, IIA y IIB, han sido descritas, como anteriormente se menciona, en una gran variedad de células eucarióticas y muestran diferencias en el peso molecular de su subunidad más larga llamada IIO, IIA y IIB respectivamente. El trabajo de Kim y Dahmus (Kim y Dahmus 1986) tiene como objetivo establecer la estructura molecular "In vivo" de la RNA polimerasa II en células de mamífero y examinar las condiciones que influyen en la estabilidad de las subespecies de la RNA polimerasa II. Se utilizaron anticuerpos policlonales (preparados por inmunización con enzima purificada obteniendo anticuerpos específicos contra las subespecies IIA y IIB a partir de un suero policlonal de conejo) para determinar la concentración relativa de subunidades IIO, IIA y IIB en extractos crudos de timo de ternera, en células cultivadas de riñón de bovino y en células HeLa. Las células HeLa contienen casi exclusivamente RNA polimerasa IIO (Kim y Dahmus 1986) y el tejido de timo de ternera y las células de riñón contienen RNA polimerasa IIO y IIA. Los extractos celulares de timo de ternera fueron mantenidos (añejados) a 4° o a 37°C y la estabilidad de la RNA polimerasa IIO y IIA determinada por blotting de proteínas. En la presencia del amortiguador normalmente usado para la purificación de la RNA polimerasa, la subunidad IIO desaparece de extractos de timo de ternera en 24 horas a 4° C o en 5 min a 37°C. La RNA polimerasa IIO es parcialmente estabilizada por la inclusión de inhibidores de proteasa y completamente estabilizada por la presencia de altas concentraciones de EDTA y EGTA. Un incremento en la cantidad de agente reductor causa una reducción en la estabilidad de IIO. El anticuerpo que es usado en este estudio (Kim y Dahmus 1986) reacciona de manera cruzada con la subunidad IIO esto implica un alto grado de conservación en los determinantes reconocidos por el anticuerpo. Es notable que el anticuerpo específico contra IIA, reacciona tres o cuatro veces más fuerte con la subunidad IIO y tres o cuatro veces menos fuerte con la subunidad IIB. Este anticuerpo contra IIA reacciona más fuertemente con el DCT de las subunidades IIO y IIA.

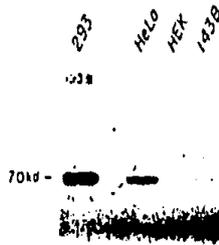
No hay reportes sobre las condiciones de estabilidad de la RNA polimerasa IIO en células HeLa.

Choque Térmico (Heat Shock) y su respuesta.

Los beneficios potenciales de la hipertermia (la exposición a altas temperaturas) en el tratamiento del cáncer humano ha sido reconocido ya en estos tiempos. El interés desarrollado se basa en que la hipertermia, de manera opuesta a las radiaciones inactiva células hipóxicas (como ocurre en los tumores) la hipertermia mata preferencialmente a las células a bajo pH y por último, la hipertermia inactiva la fase S de las células e interactúa sinérgicamente con las radiaciones (Harkedar 1976, Miller y cols. 1977, Connor y cols. 1977, Suit 1977, Dewey y cols. 1977, Overgaard y Bichel 1977). La mortalidad celular puede ser relacionada con los

HeLa	143B
37° 42°	37° 42°

70kd -

Anexo. Arriba, inmunoprecipitación de la proteína ch t de 70kd humana. Las células HeLa y las 143B fueron incubadas a 42 C y colocadas a temperatura de cultivo por 2 horas.

Abajo, detección de la proteína ch t de 70kd humana por ensayos de Western blot.

(Tomado de Imperiale, Hung-Teh Kao, Feldman, Nevins, y Strickland. Molecular and cellular biology , May 1984.).

efectos del calor sobre la estructura de la proteína, los parámetros termodinámicos de la muerte hipertérmica se correlacionan con los parámetros termodinámicos de la desnaturalización de las proteínas (Rosenberg y cols. 1971).

La termotolerancia es definida como la pendiente reducida de las curvas de sobrevivencia al calor después del condicionamiento térmico (Henle y Delhelsen 1978), éste tipo de condicionamiento puede ser inducido en células humanas cultivadas, o en células de hamster por un brevísimo tratamiento a alta temperatura (44-45° C) seguido de un período de recuperación a 37°C (Gerner y cols. 1976. Henle y cols 1978). El efecto de la termotolerancia es el aumento hasta de 10 veces de los niveles de sobrevivencia. En 1981 Slater y cols. reportaron la inducción de un grupo específico de proteínas p ch t¹ en células HeLa, su inducción requiere de un tratamiento breve de hipotermia (5 a 10 min. a 45°C) y su síntesis máxima se presenta después de 2 horas a 37°C. La función de estas p ch t¹ (proteínas choque térmico) puede ser la de mantener y reparar la homeostasis celular después del tratamiento hipertérmico inicial (Ashburner y Bonner 1979). Gerner y cols. (1976) reportaron que después de un período de 60 minutos de hipotermia (44°C) las células HeLa requirieron de 2 horas a temperatura de cultivo para el máximo desarrollo de la termotolerancia. Henle y cols. (1978) con células de ovario de hamster chino (células CHO) encontraron que el desarrollo máximo de la termotolerancia también requería 2 horas a 37°C después de un tratamiento inicial de 5 minutos a 45°C. Existen otros inductores de la respuesta choque térmico; ha sido reportado (Johnston y cols. 1980; Levinson 1980) que una gran variedad de reactivos sulfidrilos, metales de transición y agentes quelantes inducen las mismas proteínas que las que se presentan en el choque térmico en células de ave (fibroblastos de pollo). El tratamiento de células HeLa con arsenito de sodio parece ser el que tienen efecto similar al choque térmico ya que induce las p ch t¹ de 100, 72,74 kd; los tratamientos con cadmio y cobre inducen la síntesis de las proteínas de 72-74 kd.

La transcripción en células HeLa también es afectada por la hipotermia (Zieve y cols. 1977). A 43°C el RNA¹ y el RNA 5S, que son sintetizados por la RNA polimerasa III, permanecen sin afectarse pero la síntesis de los RNA ribosomales es totalmente inhibida lo cual indica que la RNA polímera es afectada en el desarrollo de su función. La respuesta choque térmico tiene su origen en la transcripción (Ashburner y Bonner 1979), aparentemente hay una adición de controles auxiliares para hacer efectiva la respuesta. La búsqueda de secuencias específicas choque térmico que pueden controlar la transcripción de los genes choque térmico fué exitosa al descubrirse que el gene de proteína ch t¹ de *Drosophila* podía ser clonado y expresado en una variedad de células de organismos no relacionados (Corces y cols. 1981. Lis y cols. 1982. Mirault y cols. 1982. Pelham y Bienz 1982). Trabajos subsecuentes definieron una secuencia conservada que se extiende de -70 a -40 corriente arriba en los genes ch t¹, está localizada corriente arriba de la caja TATA y ambas son necesaria para la respuesta choque térmico del gene. La secuencia consenso derivada del análisis de seis genes hsp¹ de *Drosophila* es CT-GAA-TTC-AG (14 a 28 bases)-TATA, esta secuencia consenso contiene una de las muchas repeticiones invertidas encontradas en esta región (Pelham 1982, Pelham y Bienz 1982). Existen dos

factores involucrados en la transcripción de los genes *ch t*: el FTCHT, factor de transcripción de choque térmico, que se ha encontrado y que es requerido junto con el factor A (TFIIA) para activar la transcripción del gene *hsp70*, el factor FTCHT se une a la región de 55 pb, que contiene la secuencia consenso de *ch t*, corriente arriba de la caja TATA y el factor B que junto con el HSTF se unen simultáneamente al gene *hsp70*. El FTCHT de células no tratadas con calor tiene actividad de enlace pero no de iniciación mientras que en células tratadas con choque térmico tiene ambas actividades y el factor B disminuye en su nivel de actividad de 5 a 10 veces en este tipo de células. De estudios de transcripción *in vitro* ha surgido un modelo en el cual el cambio de temperatura hace presente una disminución de la cantidad del factor B así como la activación del FTCHT y la transcripción de genes *ch t* a nivel alto es comenzada (Parker y Topol 1984). El trabajo de Parker y Topol (1984) sugiere que la forma transcripcionalmente inactiva del factor FTCHT en células normales puede ser un producto proteolítico derivado de una forma activa existente en células tratadas con choque térmico.

La exposición de células de una gran variedad de especies a un incremento en la temperatura resulta en un aumento de la síntesis de varias proteínas las cuales han sido llamadas proteínas choque térmico o *pcht*. Este fenómeno ha sido llamado la "respuesta choque térmico o heat shock" y este término es aplicado a exposiciones a químicos como etanol, a inhibidores de fosforilación oxidativa, a infección por virus y a muchos otros que muestran la inducción de las mismas proteínas y esta respuesta ha sido observada en cada especie que ha sido estudiada. La respuesta choque térmico es universal y ocurre bajo una gran variedad de diferentes condiciones de estrés.

Las funciones de las proteínas *ch t* ha sido por mucho tiempo especulada y se asume que estas proteínas protegen a la célula de los efectos del estrés. Los estudios *in vitro* han hecho posible identificar varias reacciones ATP-dependientes que involucran a las proteínas parecidas a las *pcht70* (las dos proteínas que más se sintetizan en células estresadas son las *pcht70* y las *pcht90*), las proteínas que están relacionadas con las *pcht70* y las *pcht90* y cuya síntesis está regulada por la falta de glucosa han sido localizadas en el retículo endoplásmico, esto limita las posibles funciones de estas proteínas a pocos procesos metabólicos que toman lugar en este compartimiento celular. *E. coli* contiene una sola proteína *pcht70* que es el producto del gene *dnak* (Bardwell y Craig 1984), levaduras, *Drosophila* y mamíferos contienen una familia de proteínas *pcht70* que tienen secuencias relacionadas; estas proteínas se unen firmemente al ATP y algunas de ellas comparten con la proteína *dnak* la capacidad de hidrolizarlo bajo condiciones apropiadas (Zilicz y cols. 1985). Las tres proteínas principales parecidas a las *pcht70*, la *pcht70*, la *hsc70* (proteína *ch t* análoga) y la *grp78* (proteína originada por falta de glucosa), tienen distintas localizaciones intracelulares y patrones de expresión y constituyen la familia de las proteínas *pcht70*. Durante el choque térmico muchas proteínas nucleares llegan a ser insolubles y son operacionalmente definidas como parte de la matriz nuclear, ambas proteínas *pcht70* y *hsc70* migran al núcleo y se unen a la matriz de manera hidrofóbica. Subsecuentemente se concentran en el nucleolo donde se unen a los ribosomas parcialmente ensamblados (Welch y Suhan en

prensa); el nucleolo es muy sensible a los aumentos de temperatura pero se ha demostrado que células transfectadas con un plásmido que produce pch170 aceleran su recuperación después de un choque térmico (Pelham 1984), esto parece indicar que una de las funciones de la proteína pch170 puede ser la reparación de prerribosomas dañados. El modelo basado en los estudios de Lewis y Pelham (1985) propone que durante el choque térmico, las proteínas llegan a desnaturarse parcialmente exponiendo sus regiones hidrofóbicas, las cuales interactúan para formar agregados insolubles; la pch170 se une firmemente a las superficies hidrofóbicas y limita tales interacciones promoviendo la disgregación, entonces usa la energía de la hidrólisis del ATP para liberarse a sí misma de su sustrato sufriendo un cambio conformacional en el proceso; tal cambio puede deformar a la proteína a la cual la pch170 está enlazada de esta manera hace frágiles sus interacciones con otras proteínas. El sustrato liberado será capaz de plegarse a su forma pre-choque y la repetición de este ciclo podría resultar en la reparación de grandes estructuras como el nucleolo.

Cuando las células son expuestas a una variedad de estreses del medio ambiente, tal como el choque térmico, la síntesis de proteínas choque térmico es inducida (Lindquist y Craig 1988). Algunas de las proteínas de choque térmico han sido altamente conservadas durante la evolución y son proteínas que ocurren de manera abundante en la célula. Aunque las funciones exactas no son claras aún, su papel de chaperonas moleculares ha sido postulada (Ellis y Van der Vies. 1991; Gething y Sambrook. 1992). Las chaperoninas son una clase mayor de chaperonas moleculares que consisten de la chaperonina 60 (también conocida como Gro EL, la proteína choque térmico 60 y ribulosa P, la subunidad de unión de la proteína carboxilasa) y la co-chaperonina, chaperonina 10 (también conocida como Gro ES) (Hemmingsen y cols. 1988). Muchos reportes han descrito la función de la chaperonina en la plegabilidad de las proteínas en los estados químicamente desnaturantes (Goloubinoff y cols. 1989. Laminet y cols. 1990. Viitanen y cols. 1990, Buchner y cols. 1991. Mendoza 1991, Badcoe y cols. 1991. Martin y cols. 1991. Taguchi y cols. 1991. Langer y cols. 1992). Como se mencionó anteriormente, las chaperoninas son proteínas choque térmico y por esto, el efecto de la chaperonina en el proceso de desnaturación por calor de otras proteínas siguió siendo investigada en detalle (Pelham 1986). Recientemente ha sido encontrado que Gro EL suprime la agregación de alfa-glucosidasa tratada con calor y la acelera con una reactivación dependiente de MgATP in vitro (Holl-Neugebauer. 1991). También Trent y cols (Trente y cols. 1991) reportaron que una chaperonina arqueobacterial homóloga a TF55 de Sulfolobus shibatae une proteínas desnaturadas por calor. Previamente Taguchi y Yoshida (1991) reportaron que una chaperonina de una bacteria termofílica (chaperonina thermus) es purificada como un complejo binario de chaperonina 60 y chaperonina 10 y muestra habilidad para facilitar el plegamiento de varias enzimas termofílicas (Taguchi y cols. 1991. Ishii y cols. 1992). Las chaperoninas no se desnaturizan y son estables hasta más arriba de los 80°C. El estudio previo de Taguchi y cols. (1991) y el reporte de Taguchi y cols (1993) sobre la función de las chaperoninas sugieren que la chaperonina se une a intermediarios plegables los cuales ocurren durante el plegamiento del estado químicamente desnaturante y el complejo entre la chaperonina y

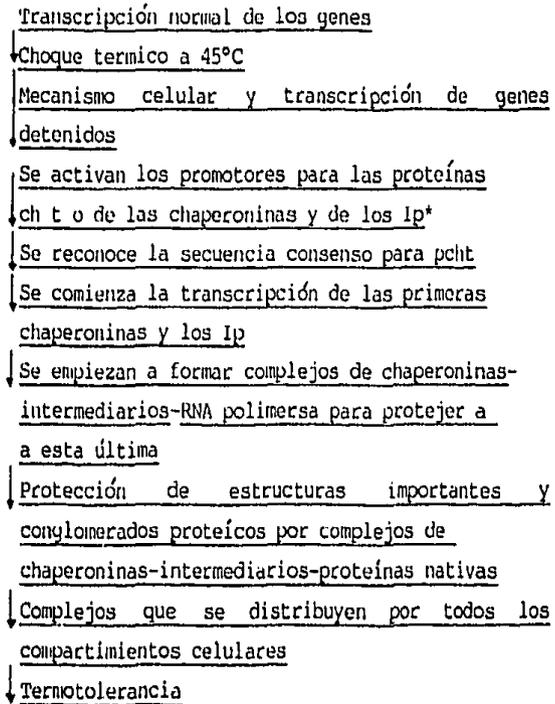


Fig.9. Modelo para la respuesta Choque Térmico.

En este modelo, basado en la información aquí expuesta, se esquematiza la respuesta a nivel transcripcional.

Los intermediarios plegables es estable de alguna manera en la ausencia de MgATP. La chaperonina puede reconocer y unirse a una estructura proteica en especial la cual ocurre durante la desnaturalización por calor. Los intermediarios de desnaturalización capturados por la chaperonina retienen la habilidad de recuperar la plegabilidad cuando son puestos en óptimas condiciones con MgATP. Se puede concluir en base a lo reportado que sin chaperoninas las estructuras proteicas no tienden a recuperarse. Los intermediarios plegables son capturados por las chaperoninas, una vez capturado, el intermediario es protegido de la desnaturalización irreversible hasta que la chaperonina misma es colapsada por el calor. Las chaperoninas protegen a los intermediarios plegables lábiles al calor, pero no a las proteínas nativas.

Las pequeñas proteínas ch1 tienen una masa molecular entre 15 y 30 kd, son estructuras oligoméricas de cerca de 32 subunidades, correspondiente a una masa molecular de 800 kd (Jakob, Gaestel, Engel y Buchner 1993). Están presentes en el citosol de la mayoría de las células y tejidos aún en la ausencia de los factores de estrés tal como las elevadas temperaturas. La región C-terminal de las proteínas del cristalino, alfa-B-cristalina, es homóloga a las pcht sobre el nivel de secuencia; ya que otros miembros de la familia de proteínas estrés están involucradas en la formación y mantenimiento de la estructura proteica ambos bajo condiciones fisiológicas y de estrés; en analogía a la contraparte humana, las chaperonas moleculares parecen impedir las interacciones ilegítimas entre diferentes cadenas de polipéptidos durante el proceso de formación de las estructuras o sobre el desdoblamiento bajo condiciones de choque térmico sin parte apropiada de la estructura final. Recientemente se ha demostrado que también la familia de las proteína ch190 (Hsp90) pertenecen a la clase de chaperonas moleculares, estas proteínas impiden la agregación de elementos extraños durante el replegamiento y se mantienen la dependencia del ATP (Wiech y cols. 1992).

Poco se conoce sobre el efecto del choque térmico en la RNA polimerasa II, sobre el efecto en los cultivos celulares y su morfología.

Objetivos Generales :

- 1.-Analizar las condiciones de estabilidad de la RNA polimerasa II.
- 2.-Analizar el efecto del Choque Térmico sobre la estabilidad de la RNA polimerasa II.

Objetivos específicos:

- 1.-Conocer las condiciones y el comportamiento de la RNA polimerasa II ante los amortiguadores usados normalmente para su detección.
- 2.-Conocer el comportamiento de la enzima ante el amortiguador preparado para su estabilidad.
- 3.-Conocer el comportamiento de la enzima ante el amortiguador preparado para su degradación (proceso que llamamos añejamiento) a temperatura de 4°C, 25°C y 37°C.
- 4.-Conocer el comportamiento y la estabilidad de la enzima ante el choque térmico en células HeLa.
- 5.-Observación de la morfología de cultivos de células eucarióticas después del choque térmico.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.

Para cubrir el primer objetivo general se realizaron extractos totales de células HeLa en los siguientes amortiguadores :

All de control: Tris- HCl pH 7.9 2M, 2 mM KCl, 2mM MgCl₂, 2 mM EDTA de un stock 0.5mM, 12.5% Glicerol, 2mM β- me, 8.7 PMSF.

E de estabilidad : Tris HCl pH 7.9 50mM., EDTA 2mM , EGTA 2mM, glicerol 12.5 %, DTT 0.5mM. PMSF 2mM.

All* de degradación o All* de añejamiento : Tris HCl Ph 7.9 50mM, EDTA 2mM, EGTA 2mM, glicerol 12.5%, DTT 5mM, PMSF 2mM.

Dichos extractos se mantuvieron por diferentes tiempos a temperatura ambiente (25°C), a temperatura de 37°C o a 4°C (añejamiento).

Posteriormente se migraron electroforéticamente en geles de poliacrilamida SDS ,las proteínas se transfirieron a filtros de nitrocelulosa y se realizaron en ellos la inmunodetección con anticuerpos policlonales dirigidos contra la RNA polimerasa II.

Para realizar el segundo objetivo general los cultivos celulares se sometieron a un choque térmico a diferentes tiempos a 45°C y se prosiguió con los tsados celulares y con el método usual de Western blot. A algunos cultivos además de ser tratados por hipertermia se les administró un periodo de recuperación a temperatura de cultivo , los tiempos estuvieron dados por las condiciones del experimento.

Posteriormente se migraron electroforéticamente en geles de poliacrilamida SDS, las proteínas se transfirieron a filtros de nitrocelulosa y se realizaron en ellos la inmunodetección con anticuerpos policlonales dirigidos contra la RNA polimerasa II.

Los estudios de la morfología celular fueron llevados a cabo colocando los cultivos después del tratamiento hipertérmico en el microscopio (microscopio invertido de contraste de fases modelo IMT2) y fotografiados.

MATERIALES.

Los materiales y reactivos requeridos para este trabajo son:

Lineas celulares.

Células HeLa derivadas de un carcinoma de cervix humano CCL 2-ATCC.

Células CV-1P derivadas de riñón de mono CCL70-ATCC.

Células PK-15 de riñón de cerdo.

Material para el cultivo de células.

Medio Eagle Modificado (Dulbecco) de Laboratorios Gibco (EUA).

Suero fetal de ternera y de caballo de Laboratorios Gibco (EUA).

Cajas Petri para cultivo de 60 y 100 mm de diámetro de Costmar y Falcons Labs.

Penicilina G sódica cristalina, y sulfato de estreptomina de Farmacética Lakeside (México).

Reactivos.

Nitrógeno líquido.

Pollacrilamida.

SDS.

Metanol, ácido acético.

Filtros de nitrocelulosa.

Papel Whatman 3MM

Anticuerpo de conejo contra RNA polimerasa II de timo de ternera purificada.

Albúmina bovina.

proteína A.

I- 125 de Amersham .

EGA-pac.

Película Kodak X-Omat AR para rayos X.

Pantalla Intensificadora Dupont Cronex Lightning-plus.

Solución de Iodogen.

Cloroformo.

Nitrógeno gaseoso.

2-mercaptoetanol.

Columna de 0.75 x 15 cm de Sephadex G-10.

Trietanolamina- HCl.

Rollo de película de 35mm para impresiones en papel.

Preparación de soluciones, Amortiguadores y Medios.

Todas las soluciones y los amortiguadores fueron preparados con agua bidestillada estéril (autoclave a 22 libras /cm de presión, 120°C,20 minutos) y las soluciones que no pueden ser esterilizadas en autoclave fueron esterilizadas utilizando membranas millipore para filtración (GS de 0.22 um).

MEDIO DULBECO.

El contenido de un paquete comercial se disolvió en 890 ml de agua bidestillada estéril, se le adicionó 3.7 gr. de bicarbonato de sodio y 3.5 gr. de dextrosa, con CO gaseoso, pH 7.4 y se esterilizó por filtración. Para utilizarlo para células 293, CV-1P y PK-15 se le adiciona el 10% de suero neonato y 1% de solución de antibióticos (penicilina-estreptomicina). Para células HeLa, CV-1P, y PK-15 se le adiciona 10% de suero fetal de caballo y solución de gentamicina a una concentración de 50 mg/ml.

SOLUCION DE PENICILINA-ESTREPTOMICINA 100x.

5 millones de unidades de penicilina G sódica y 5 gr. de estreptomina se disolvieron en agua bidestillada estéril, y se aforaron a un litro para ser después filtrados (filtros millipore). Se almacenó a -20°C.

SOLUCION DE TRIPSINA 0.05% Y EDTA 0.02% (1000ml).

Se disuelven los siguientes reactivos: NaCl 8gr, Dextrosa 1gr, NaHCO 0.58gr, Tripsina 0.5 gr, EDTA 0.2 gr, rojo de fenol al 0.5% 0.5ml. Se ajustó el pH a 7.4 con HCl 0.1 N. Se esterilizó con filtro y se almacenó a -20°C.

AMORTIGUADORES:

Amortiguador AII (Control):

Tri-HCl pH 7.0,EDTA 2mM, 6.25 ml Glicerol,EGTA 2 mM, PMSF 2mM.

Amortiguador E: (Estabilidad)

Tris-HCl pH 7.9 50 mM,EDTA 10mM,EGTA 10mM,glicerol 12.5%,PMSF 2mM.

Amortiguador AII * (Degradación o añejamiento):

Tris-HCl pH 7.9 ,50 mM, EDTA 2mM, EGTA 2mM, glicerol 12.5%, DTT 5mM, PMSF 2mM ,0.1% β -Me.

Solución de Coomassie:

Metanol 45%, ácido acético 9%, azul brillante de Coomassie R250 0.25 %.

Solución WB (de lavado):

Tris-HCl 10mM pH 7.4, Tritón X-100 0.5%, SDS 0.2%, NaCl 150mM.

Para este trabajo se utilizó el microscopio invertido de contraste de fases modelo IMT2 Olympus optical Co..

METODOS:

Amortiguadores.

Cultivo de Células HeLa.

Las células HeLa (derivadas de un carcinoma de cervix humano) fueron crecidas en monocapa, en medio esencial mínimo (MEM), suplementado con 10% de suero fetal de ternera, 1% de antibióticos. Las células se crecen hasta confluencia y se resiembran en cajas p-100 con aproximadamente 10 millones de células o en cajas p-60 con aproximadamente 6 millones de células. Se crecieron en la incubadora en atmósfera conteniendo 10% de bióxido de Carbono a 37°C.

Estas células fueron utilizadas para los ensayos de estabilidad y de Choque Térmico retirándoles el medio y resuspendiendo en los amortiguadores de control, de estabilidad o de añejamiento, alicuotando y congelando después de los periodos y la temperatura que se especifica en cada experimento.

Cultivo de células CV-1P.

Las células CV-1P (derivadas de riñón de mono) fueron cultivadas en monocapa en medio esencial mínimo (MEM) modificado por Dulbecco (Medio Dulbecco) suplementado con 10% de suero de ternera y 1% de penicilina estreptomycin (PE) concentración 1X en cajas p-100. Las células crecen hasta confluencia y se resiembran en cajas p-100 con aproximadamente 10 millones de células o en cajas p-60 con aproximadamente 6 millones de células. Se crecieron en incubadora en atmósfera conteniendo 10% de bióxido de carbono a 37°C.

Estas células se utilizaron para el análisis de la morfología después del Choque térmico colocándolas por diferentes periodos en un baño a 45°C y colocándolas en el microscopio para fotografiarlas.

Cultivo de células PK-15.

Las células PK-15 (derivadas de riñón de cerdo) fueron cultivadas en monocapa en medio esencial mínimo modificado por Dulbecco suplementado con 10% de suero fetal de ternera y 1% de PE concentración 1X en cajas p-100. Las células crecen hasta confluencia y se resiembran en cajas p-100 con aproximadamente 10 millones de células o en cajas p-60 con aproximadamente 6 millones de células. Se crecieron en incubadora con atmósfera conteniendo 10% de bióxido de carbono a 37°C.

Estas células se utilizaron para el análisis de la morfología después del Choque Térmico y se colocaron en un baño a 45°C durante diferentes periodos y se colocaron en el microscopio para fotografiarlas.

Westem-blot.

Geles de poliacrilamida - SDS. Se utiliza la metodología descrita originalmente por Laemmli (1970). El gel se hace en gradiente lineal de 5- 17.5 % de acrilamida. Alcuotas de 100 µl son colocadas en cada carril. Los geles se corren a 60-70 volts durante la noche ó a 22 mA hasta que el colorante alcanza el borde del gel. Los geles se tiñen con azul de Coomassie (metanol 45%, ácido acético 9% , azul brillante de Coomassie R250 0.25%, ácido acético 7.5%) como lo describe Wray et. al. (1981) generalmente durante un día, tiempo necesario para obtener un fondo claro en el gel.

Transferencia de proteínas a nitrocelulosa. El gel de poliacrilamida SDS se equilibra en amortiguador de transferencia (método de Towbin y cols. 1979) durante 30 minutos con dos cambios de amortiguador. El filtro de nitrocelulosa se remoja en el mismo amortiguador durante 10 a 15 minutos . La transferencia se realiza con el filtro de nitrocelulosa y el gel en medio de 2 papeles Whatman 3 MM. El filtro se coloca siempre del lado del ánodo (+). La transferencia se inicia con un voltaje de 150-200 volts (400 mA); cuando la corriente llega a 900 mA, se reduce el voltaje lo necesario para mantener la corriente entre 700 y 900 mA, durante el resto de la transferencia (5 horas) en el cuarto frío.

Inmunodetección de proteínas. El filtro de nitrocelulosa se incuba a temperatura ambiente toda la noche en solución WB (Tris-HCl 10 mM pH 7.4, Trilón X-100 0.5%, SDS 0.2%, NaCl 150 mM) con 3% de albúmina bovina (bloqueo). Al terminar el bloqueo, se incuba el filtro con anticuerpo de conejo contra RNA polimerasa II de timo de ternera purificada, en WB con 1% de albúmina durante 3 horas. El filtro se lava posteriormente 3 veces con WB (10 min para cada lavado).

Marcaje con I-125.

El filtro se incuba nuevamente en WB (conteniendo 1% de albúmina bovina), durante 2 horas con Proteína A-125 I (1.5 cpm) . Después de esta incubación se lava el filtro durante 1 hora con cuatro cambios de WB. El filtro se deja secar a temperatura ambiente, se envuelve en EGA-pac y se expone con película Kodak X-Omat AR para rayos X. La placa, junto con la pantalla intensificadora Dupont Cronex Lightning-Plus, se mantiene a -80°C, el tiempo necesario antes de ser revelada.

Yodación de proteína A. La yodación se realiza en un volumen final de 0.3 ml en trietanolamina-HCl 50 mM pH 8.0. Se usa 1 mCi de ^{125}I y 5 ml de una solución de Proteína A 5mg/ml (Farmacia). La mezcla proteína-yodo se transfiere a un tubo de vidrio ("soda lime") al cual previamente se agregan 20 μl de solución de Iodogen (Pierce Chem. Co.) (1.8 μg /ml de cloroformo) que se evapora con nitrógeno gaseoso tratando de dejar una monocapa en la parte inferior del tubo. La mezcla proteína-yodo se incuba 15 min en hielo y se transfiere a un tubo conteniendo 5 μl de 2-mercaptoetanol, para detener la reacción. La mezcla se aplica a una columna de 0.75 x 15 cm conteniendo Sephadex G-10, equilibrado en trietanolamina-HCl 50 mM (pH 8.0), se colectan las fracciones (1 ml) y se utiliza una alícuota de 2 μl para determinar la radiactividad incorporada, en un contador de radiactividad gamma; la proteína A marcada se recupera generalmente entre las fracciones 5 y 7.

Preparación de las muestras.

Las células HeLa son crecidas en MEM (como se describe anteriormente), al llegar a la confluencia las cajas p-60 son colocadas en hielo y se les retira el medio. Se lava la monocapa con los amortiguadores de control, de estabilidad y de añejamiento (cada uno de estos amortiguadores se usa según el experimento a realizar) se raspan las cajas y se alícuotan (aproximadamente 300 μl para cada alícuota) colocándolas a 4°C o a 37°C por el tiempo determinado según el experimento a realizar y se preparan para ser colocadas en el gel de poliacrilamida.

Tratamiento Choque Térmico (Heat Shock). Las cajas p-60 a confluencia se colocan en un horno que previamente se ha puesto a 45°C. Se dejan ahí por el tiempo determinado por el experimento a seguir. Las células ya tratadas se raspan y alícuotan para ser congeladas en nitrógeno líquido inmediatamente. Las células que se someten a tiempos de recuperación se colocan a temperatura de cultivo (37°C) durante el período de tiempo según el protocolo del experimento.

Para la última parte de este trabajo se colocan las cajas como anteriormente se describe en tratamiento hipertérmico e inmediatamente después del choque térmico se colocan bajo el microscopio y se toman las fotografías.

RESULTADOS.

Este trabajo se realizó en dos partes, la primer parte está basada en el estudio de Kim y Dahmus sobre las condiciones de estabilidad de la RNA polimerasa II. En esta parte se muestran los resultados de las condiciones in vitro, condiciones que involucran diferencias en los amortiguadores, cambios en la temperatura y diferentes periodos de tiempo, en las cuales la polimerasa permanece estable.

En la segunda parte del trabajo se presenta al choque térmico como una condición de tensión que logra desestabilizar a la enzima; la condición hipertérmica de desestabilización de la polimerasa II, subunidad II, involucra diferentes periodos de tiempo y dos temperaturas.

La RNA polimerasa, de acuerdo con el trabajo de Zawel y Reinberg (Zawel y Reinberg, 1993) es uno de los siete factores (IIA, IIB, IID, IIF, IIH, IIG, IIE, IIJ) sin el cual el proceso de transcripción en su etapa de iniciación y la elongación no se llevaría a cabo. Cuando la enzima se integra al complejo de preiniciación lo hace en la forma IIA (subespecie IIA que tiene el dominio carboxi-terminal sin fosforilar) y con ayuda de una cinasa pasa a la forma fosforilada IIO para comenzar la elongación interactuando directamente con los factores SII y TFIIF (Salzman y Weinman, 1989). El patrón electrofóretico de la RNA polimerasa II de timo de ternera o de hígado de rata bajo condiciones nativas reveló varias bandas. En 1974 Kedinger y cols. (Kedinger, Gissinger y Chambon, 1974) reportaron que la electroforesis de cada banda en la presencia de SDS reveló que las bandas contienen polipéptidos idénticos excepto por el más grande, el cual varía de 180 000 a 240 000 d. Ni el añejamiento deliberado del extracto crudo ni el uso de un inhibidor de proteasas como el PMSF tuvo efecto sobre la estabilidad y la cantidad de las diferentes formas de la enzima. Por esto infirieron que la heterogeneidad y la estabilidad no era debida a la proteólisis durante la purificación de la enzima. Inversamente en levaduras el uso de PMSF y el cuidadoso control del pH para minimizar la activación de las proteasas se juzgó necesario para la detección de una subunidad mayor no degradada. Kim y Dahmus en 1988 realizaron un análisis inmunológico de la polimerasa de las subespecies IIO y IIA (forma fosforilada y desfosforilada respectivamente) en el cual reportan que la polimerasa IIO es estabilizada por la inclusión de inhibidores de proteasas y altas concentraciones de EDTA y EGTA.

Prosiguendo con las condiciones que desestabilizan a la enzima Gallgio y cols en 1987 hacen un estudio sobre las modificaciones de la subespecie IIO después de la infección viral (condición de estrés) (Rangel y cols, 1987) reportando que la infección de células HeLa con poliovirus resulta en un drástico decremento de la transcripción de la célula huésped. Estos investigadores analizaron la distribución de la RNA polimerasa IIO antes y después de la

infección viral. Los análisis de la enzima libre y ligada a la cromatina indicaron que hay una significativa reducción en la RNA polimerasa II después de la infección y concluyeron que la inhibición transcripcional del huésped inducida por el poliovirus ocurre a nivel de la iniciación de la cadena e involucra alguna modificación o desestabilización de la RNA polimerasa II. En 1988, estos mismos investigadores (Rangel y cols. 1988) logran estabilizar la enzima después de la infección de poliovirus. El efecto de la cicloheximida en la desestabilización inducida por poliovirus de la RNA polimerasa fué investigada. La inhibición de la síntesis de proteínas, en periodos secuenciales durante la replicación viral (condición de tensión para la célula) impide la modificación de la RNA polimerasa unida a la cromatina. Más aún, la inclusión de Zinc a una concentración que inhibe el proceso de proteólisis postransduccional de la poliproteína viral también evita la desestabilización de la RNA polimerasa II.

Estabilización de la RNA polimerasa II subunidad II.

La inclusión de agentes quelantes (EDTA y EGTA) logra estabilizar in vitro a la enzima RNA polimerasa II así como la inclusión de agentes reductores (DTT y β -Me) logra desestabilizarla de manera que disminuye su movilidad electroforética y llega a modificarse de manera que el anticuerpo no logra reconocerla, como se muestra en los siguientes resultados. Las temperaturas utilizadas fueron las de 4°, 25° y 37°C.

Los lisados totales fueron tratados con amortiguador de estabilidad (alta concentración de EDTA y EGTA) y con amortiguador de añejamiento (DTT y β -Me) para conocer el comportamiento de la enzima; En la primer condición de estabilidad se aprecia poca diferencia con respecto al control y en la segunda condición se nota una pequeña desestabilización de la enzima que se refleja en una banda poco uniforme con respecto al control (fig. 10, carril 1 y 2). Las bandas que aparecen y que tienen peso menor con mayor movilidad electroforética no son de importancia en este trabajo ya que está enfocado a la forma II, subespecie II, de la RNA polimerasa II y el anticuerpo logra reconocerlas ya que es un anticuerpo policlonal.

Como no se encontraron diferencias importantes a tiempo cero se recurre a cambios en el tiempo con la misma temperatura de 4°C.

Los cultivos celulares fueron tratados con amortiguador de estabilidad y con amortiguador de añejamiento o degradación por 48 hrs a 4°C. En la primer condición se nota cierta irregularidad en la banda proteica de la II con respecto al control, y en la segunda condición se aprecia una banda proteica más ancha que denota una desestabilización de la enzima. La aparición de la banda de menor peso (fig. 11 carriles 1 y 2) podría deberse a una proteólisis de la enzima al desestabilizarse su estructura durante las 48 horas que está en

contacto con el amortiguador de añejamiento, estas bandas no pertenecen a las subunidades Ila ni I Ib y tienen un peso molecular de 200 Kd.

Posteriormente se realizó un experimento en donde se coloca el control a tiempo cero y la condición de degradación o añejamiento por 48 horas a 4°C mostrando una diferencia marcada entre las dos bandas proteicas, ya que la banda añejada es extensa, ocurrió un aumento en su movilidad electroforética, bajando, demostrando que esta condición desestabiliza a la enzima en su forma Ilo. (Resultado no mostrado).

Como la enzima se mostraba hasta cierto punto estable a 4°C, se decidió trabajar con una temperatura mas alta, a 25°C ya que es la temperatura a la que se trabaja normalmente en el laboratorio y esta temperatura podría afectar la estabilidad de la enzima. Los cultivos celulares se lisaron en amortiguador de degradación y se realizó una cinética de añejamiento con diferentes tiempos. Lo que se aprecia en el siguiente resultado (fig.12) es que la banda proteica con respecto al control se va desplazando hacia los 214 kd sin llegar nunca a cambiar de Ilo a Ila (no llega nunca la acción del amortiguador a desfosforilar a la Ilo) y a las 48 horas es notorio el aumento de la movilidad electroforética de la banda proteica de Ilo con la consiguiente aparición a partir de las 24 horas de una banda de proteína con un peso de 200 kd que denota una posible proteólisis y una desestabilización en la estructura de la enzima que no llega a tener, como se dijo anteriormente, el peso de Ila de 214 kd ni el de I Ib de 180 kd.

A esta temperatura se puede trabajar con la enzima hasta 2 horas sin que se produzca una degradación significativa (carriles 1-4 de la fig. 12).

Siguiendo el trabajo de Kim y Dahmus (1986) que reporta que la subunidad Ilo de la subespecie I10 de timo de ternera "desaparece" a los 5 minutos a 37°C con amortiguador de añejamiento, y tomando en cuenta que esta temperatura: a) es la temperatura de cultivo en la cual se crecen la mayoría de los cultivos celulares eucariontes, b) es uno de los parámetros que más se acerca a las condiciones "in vivo" en que se lleva el proceso de transcripción, c) es la temperatura límite a la cual se puede trabajar con la enzima ya que un aumento de este parámetro causaría la desnaturalización.

d) con este grado de calor se abarcan todos los rangos de temperatura a la que se puede trabajar con la RNA polimerasa y e) es a esta temperatura en la que la polimerasa se encuentra íntegramente activa y en pleno funcionamiento, encontrándose perfectamente delimitadas las formas IIA y I10; se trabajó tratando los lisados celulares totales con amortiguador de estabilidad y con amortiguador de añejamiento (tiempos 5, 15, 45 y 60 min.) a 37°C. En los resultados que se muestran se aprecian diferencias notables en la estabilidad de la enzima con respecto al control. La primera condición, amortiguador de estabilidad por 5, 15, 45 y 60 minutos, muestra cierta estabilidad de la enzima hasta los 45 min, tiempo en el cual el anticuerpo comienza a tener problemas para reconocer a la enzima y ya no la reconoce a los 60 minutos; la segunda

condición, amortiguador de degradación o añejamiento por 5, 15, 45, y 60 minutos, muestra que la enzima ha sufrido una desestabilización total y el anticuerpo es incapaz de reconocerla . A esta temperatura se encuentran las mayores modificaciones estructurales de la polimerasa II α , y se puede trabajar en ella hasta los 15 minutos sin afectar la estabilidad de la RNA polimerasa II α subunidad II α .

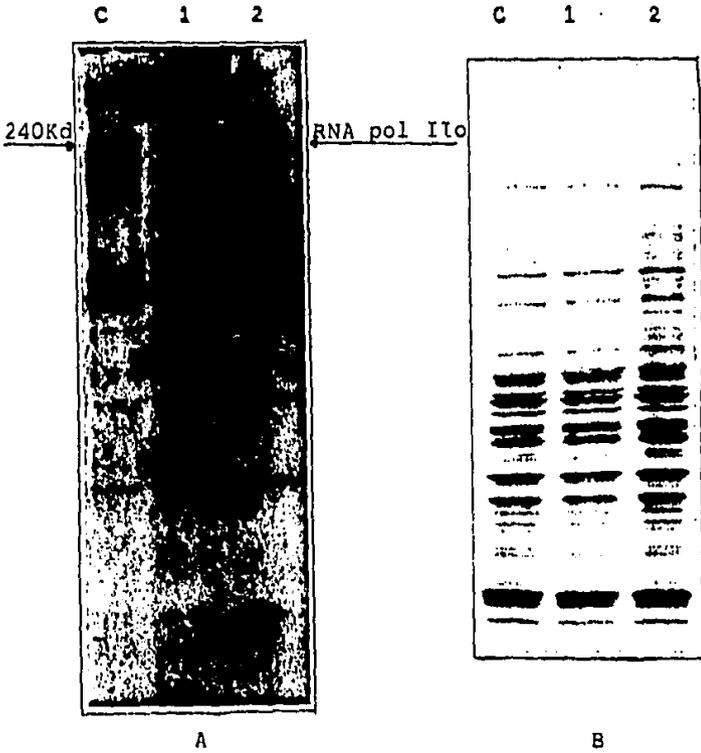


Fig.10. Inmunodetección de la enzima RNA polimerasa IIO. Los lisados totales fueron tratados con amortiguador de estabilidad (Es) y amortiguador de degradación (De). A, es la autoradiografía y B, la tinción del gel. Carril C control, carril 1 amortiguador Es, carril 2 amortiguador De. Ambos carriles con tiempo 0 a 4°C.

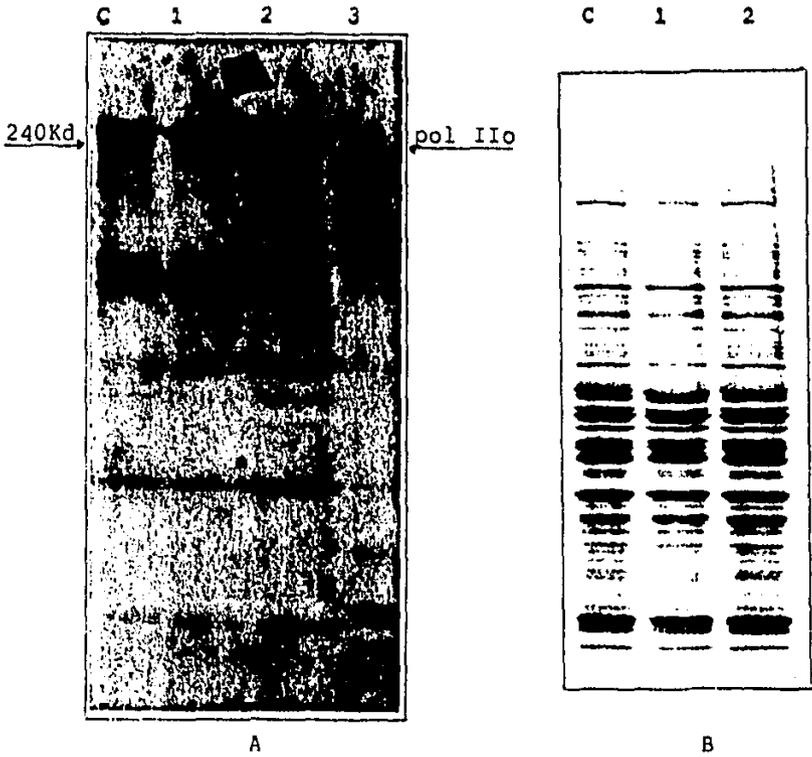


Fig.11. Estabilidad de la enzima a 48 horas a 4°C. Los lisados totales fueron tratados con amortiguador de estabilidad (Es) y con amortiguador de degradación (De). A, autoradiografía, B tinción del gel. Carril C control, carril 1 amortiguador Es por 48 horas a 4°C, carril 2 amortiguador De por 48 horas a 4°C, carril 3 marcador de peso molecular de RNA polimerasa IIO.

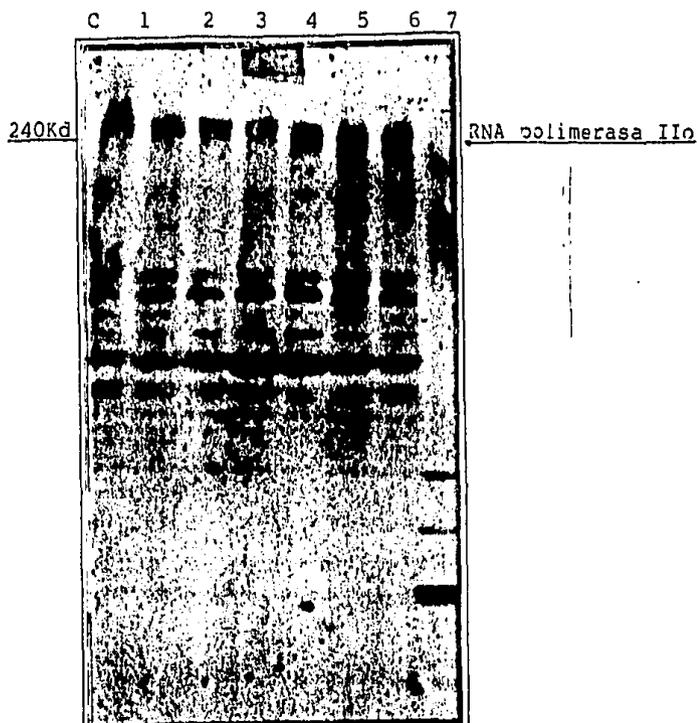


Fig. 12. Autoradiografía de la cinética de estabilización de la polimerasa a 25°C. Los lisados totales fueron tratados con amortiguador de degradación (De) a 25°C. Carril C control, carril 1 De por 0 horas, carril 2 De por 1 hora, carril 3 De por 2 horas, carril 4 De por 8 horas, carril 5 De por 24 horas, carril 6 De por 48 horas, carril 7 marcador de peso molecular.

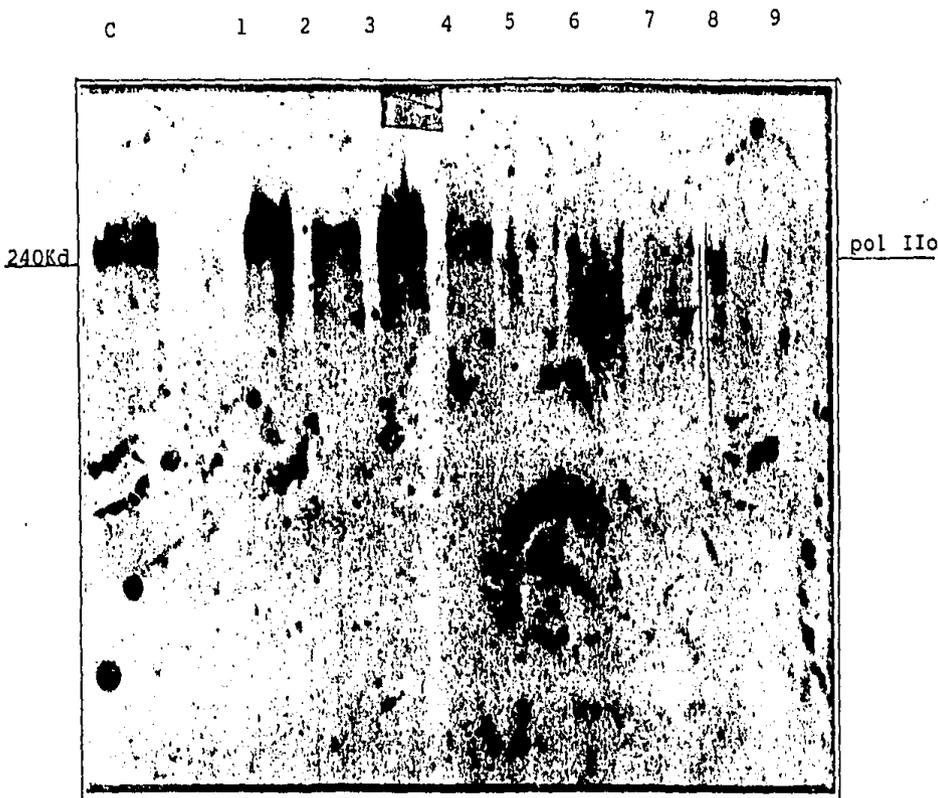


Fig. 13. Autoradiografía de la cinética de degradación y estabilidad de la enzima a 37°C. Los lisados totales fueron tratados con amortiguador de estabilidad Es y de degradación De a 37°C. Carril C control, carril 1 marcador de peso molecular de RNA polimerasa II, carril 2 Es por 5 min, carril 3 Es por 15 min, carril 4 Es por 45 min, carril 5 Es por 60 min, carril 6 De por 5 min, carril 7 De por 15 min, carril 8 De por 45 min, carril 9 De por 60 min.

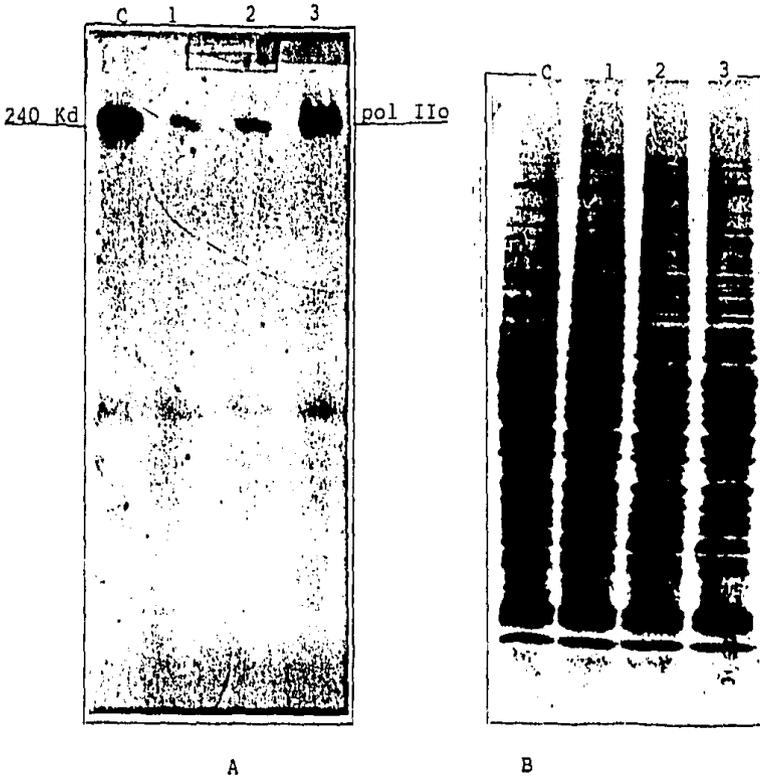
Estabilidad de la enzima RNA polimerasa IIo ante el Choque térmico.

Una de las condiciones que de manera mas importante desestabilizan a la enzima RNA polimerasa IIo subunidad IIo y que involucra algún cambio en el complejo de transcripción es el Choque Térmico. En 1962 Ritossa descubrió que específicos sitios de transcripción activa (los llamados puffs) en los cromosomas de *Drosophila busekii* pueden ser inducidos por un breve choque térmico ;en 1974 Tissières y col. descubrieron que el choque térmico induce las síntesis de un pequeño número de polipéptidos y reprime la transcripción de otros; en 1975 se descubrió la sensibilidad aumentada a la hipertermia que presentaban las células transformadas (Kase y Hahn,1975). Como lo reportó Gerner y Schneider en 1975 en células de mamífero la hipertermia causa cambios que dependen de la temperatura en los parámetros de crecimiento celular, reduce la síntesis de proteínas y del metabolismo, y conlleva a una pérdida de la capacidad proliferativa. Slater y cols. en 1981 reportan que las células humanas cultivadas responden al choque térmico por medio de un incremento en la síntesis de al menos tres clases de proteínas ,este trabajo, usando inhibidores como actinomicina D y cicloheximida, sugiere que el control de esta respuesta en células HeLa es ejercido a nivel transcripcional.

La respuesta choque térmico, como lo reporta Ashburner y Bonner en 1979, es primeramente de origen transcripcional. Trabajos subsecuentes han encontrado una secuencia conservada que se extiende entre las posiciones -70 y -40 corriente arriba (upstream) de los genes *cht*. (Pelham 1982). Existen tres factores que permiten a la polimerasa reconocer estas secuencias en el promotor e iniciar la transcripción de estos genes *cht* ,estos factores fueron reportados por Parker y Topol en 1984. En años más recientes se postula la síntesis de chaperoninas, proteínas *cht*, que tienen la función específica de proteger a los complejos proteicos mas importantes de la célula (Jakob y cols. 1993).

Lo cual nos lleva a preguntar el comportamiento de la polimerasa ante el choque térmico .Los resultados que se muestran afirman que la polimerasa IIo sufre una desestabilización temporal la cual no permite al anticuerpo policlonal reconocerla , así mismo se recurre a la temperatura de cultivo para una recuperación tanto de la maquinaria transcripcional como de la misma enzima.

A los cultivos celulares se les dió el choque térmico durante 5, 15 y 60 minutos; el resultado muestra una reducción dramática en la estabilidad de la enzima , la disminución en la intensidad de la banda proteica es notoria con respecto al control (fig 14 carriles 1 y 2) debido probablemente a que el tratamiento hipertérmico afecta directamente a la enzima



Fi.14. Efecto del choque térmico sobre la estabilidad de la RNA polimerasa IIo. Los lisados totales fueron tratados con choque térmico a 45°C, A autoradiografía, B tinción del gel, carril C control, carril 1 choque térmico por 5 min, carril 2 choque térmico por 15 min, carril 3 choque térmico por 60 min.

desnaturalizando parte de su estructura terciaria , considerando que 5 y 15 minutos es un periodo corto de tratamiento hipertérmico como lo reporta Burdon y Cutmore en 1982.

Examinando los resultados anteriores se prosiguió con el siguiente experimento para conocer la estabilidad de la enzima a tiempos más largos de tratamiento hipertérmico , 1, 2, 3, 4 y 5 horas . La estabilidad de la enzima permaneca constante durante las cinco horas de choque térmico, lo cual se muestra en el siguiente resultado (fig. 15) . La RNA polimerasa tolera el choque térmico por tiempos largos (5 horas) sin que se aprecie algún efecto sobre ella, se podría decir que la célula ha adquirido termotolerancia (Craig, 1985) es decir que existe una correlación entre la presencia de las pct⁺ y la resistencia de la célula al tratamiento hipertérmico además de que logra llevar a cabo todo el metabolismo celular teniendo la protección de sus conglomerados proteicos más importantes por medio de las chaperoninas.

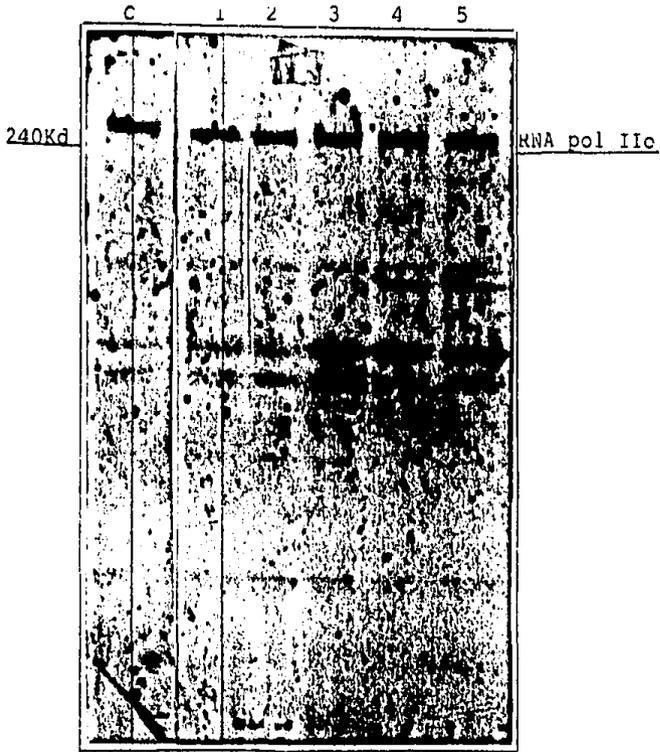


Fig.15. Efecto del choque térmico sobre la RNA polimerasa en tiempos largos. Los lisados totales recibieron tratamiento hipertérmico a 45°C, carril C control, carril 1 ch t por 1 hora, carril 2 ch t por 2 horas, carril 3 ch t por 3 horas, carril 4 ch t por 4 horas, carril 5 ch t por 5 horas.

El siguiente experimento se hizo con el fin de analizar la estabilidad de la enzima durante el cultivo celular un cierto tiempo de recuperación a 37°C.

Los resultados que se ven enseguida (fig 16) muestran que la enzima se desestabiliza de manera después del choque térmico durante 5 y 15 minutos que el anticuerpo es incapaz de reconocerla a pesar de permanecer 2 horas a 37°C; la banda proteica que corresponde a un tratamiento por 60 minutos de choque térmico con 2 horas de recuperación tienen una intensidad uniforme denotando una enzima estabilizada que es bien reconocida por el anticuerpo; la siguiente condición que es la de 5 minutos de choque térmico con 24 horas de recuperación muestra una banda casi imperceptible (carril 7) lo que denota una enzima que es completamente desestabilizada y que tal vez ha sufrido un rompimiento proteolítico; después de 15 minutos de choque térmico la polimerasa II parece recuperar su estabilidad (carril 8) y por último a los 60 minutos de choque térmico con 24 horas de recuperación muestran una enzima completamente estabilizada y reconocida por el anticuerpo (carril 9).

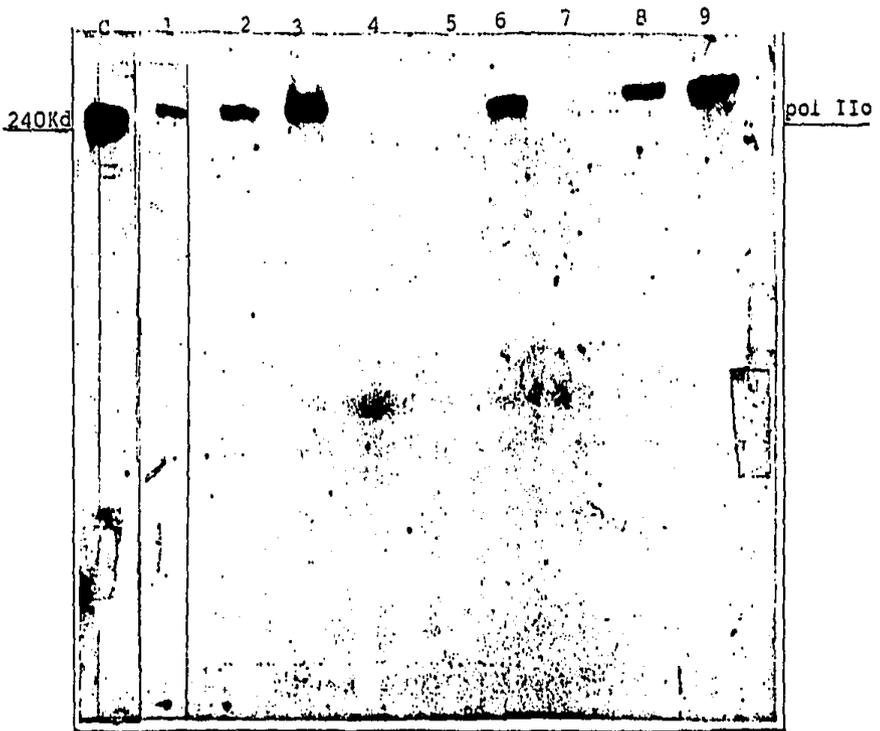


Fig.16. Efecto del choque térmico sobre la estabilidad de la RNA polimerasa IIo con tiempos de recuperación. Después del choque térmico los cultivos fueron colocados a 37 C . Carril C control, carril 1 ch t por 5 min, carril 2 ch t por 15 min, carril 3 ch t por 60 min, carril 4 ch t por 5 min con 2 horas a 37 C, carril 5 ch t por 15 min con 2 horas a 37 C, carril 6 ch t por 60 min con 2 horas a 37 C, carril 7 ch t por 5 min con 24 horas a 37 C, carril 8 ch t por 15 min con 24 horas a 37 C, carril 9 ch t por 60 min con 24 horas a 37°C.

Morfología de cultivos celulares eucariontes después del choque térmico.

El siguiente bloque de resultados muestran el efecto del choque térmico sobre los cultivos celulares eucariontes. No existe hasta la fecha algún reporte que mencione el efecto sobre la morfología de los cultivos celulares con los cuales regularmente se trabaja en los laboratorios.

El desarrollo de nuevos métodos para el cultivo de células animales *in vitro* ha contribuido en forma extraordinaria al progreso de la biología y la genética en general. (Wolstenholme, 1971); los cultivos de células primarias obtenidas a partir de tejidos cancerosos difieren de las de células normales en que tienden a formar monocapas y las células están orientadas al azar (por ejemplo las células HeLa); las células cancerosas pueden resistir un número mayor de pases que las normales, presentando el fenómeno de inmortalidad, dichas células crecen rápidamente para formar una monocapa y a continuación el ritmo de crecimiento disminuye considerablemente (Weber y Rubin, 1971). A través de los repetidos pasos a que son sometidas, las líneas celulares presentan cambios considerables, debido a la aparición y a la selección de variantes. De esta forma, las células se superponen y se orientan irregularmente con respecto a las demás. Estas líneas celulares transformadas son generalmente neoplásicas es decir, producen cáncer en caso de ser transplantadas a un animal isogénico (Baserga y Stein, 1971).

La célula se une a la base del frasco de cultivo por algunos puntos, hallándose separada de él por una fina capa de medio. Los puntos de unión se ponen de manifiesto después de un tratamiento moderado con tripsina: el citoplasma se retrae hacia el núcleo, pero sigue conectado con los puntos de unión, célula-célula, mediante delgados pseudópodos. En estas células se observan microtúbulos en las partes extendidas del citoplasma, formando el esqueleto celular (Wessells y cols. 1971).

Como lo reporta Kase y Hahn en 1975 las células transformadas son mayormente afectadas por el tratamiento hipertérmico y son rápidamente destruidas por él. Estos investigadores trabajaron con fibroblastos de embrión de pulmón transformados con SV-40, encuentran que se detiene su crecimiento exponencial después del choque térmico así como la capacidad de sobrevivencia.

En base a estos datos reportados se trataron los cultivos de células cancerosas (HeLa) y células transformadas (CVP y PK15) con choque térmico para conocer el efecto sobre la morfología celular.

El cultivo de células HeLa fué expuesto al choque térmico (45°C) por 5, 15, 30 y minutos (fig. 17) y observada su morfología; lo primero que se nota es la cantidad en aumento de células muertas (formas redondeadas y de color blanco); los espacios en la monocapa van haciendo visibles conforme avanza el tratamiento hipertérmico (c, d); a los 30 minutos

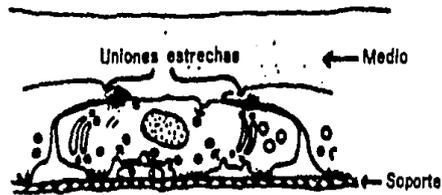


Fig. 9. Corte transversal esquemático, de un cultivo sobre un soporte sólido en medio líquido. Los microfilamentos se indican en negro. El medio está situado en el exterior de las células como en las vesículas pinocíticas. (Modificado de Brunk y cols. 1971).

tratamiento se comienzan a notar alteraciones en la morfología (d) las células muestran cambios importantes en su morfología hasta los 60 minutos de choque térmico (e) notándose pequeñas estructuras parecidas a pseudópodos que salen de la membrana plasmática y se comunican con otras células de la vecindad, su forma original ha sido pérdida casi en su totalidad y observando el control se puede ver claramente que las células han perdido el contacto entre membrana-membrana de las células cultivadas normales en monocapa; los espacios son debidos a la cantidad de células que no lograron sobrevivir y que flotan en el medio; la mayoría de las células presenta pequeñas vacuolas que podrían deberse a enormes conglomerados de proteína que se están pegando unas a otras al exponer sus partes hidrofóbicas ya que están siendo parcialmente desnaturalizadas o bien a que están siendo protegidos en enormes complejos Chaperoninas-intermediarios-proteínas nativas; las células tienden a alargarse. Se puede trabajar con las células HeLa hasta los 30 minutos de choque térmico sin que se aprecie efecto sobre la monocapa y se puede trabajar con ellas hasta los 15 minutos de tratamiento hipertérmico sin que sufra alteraciones la morfología celular.

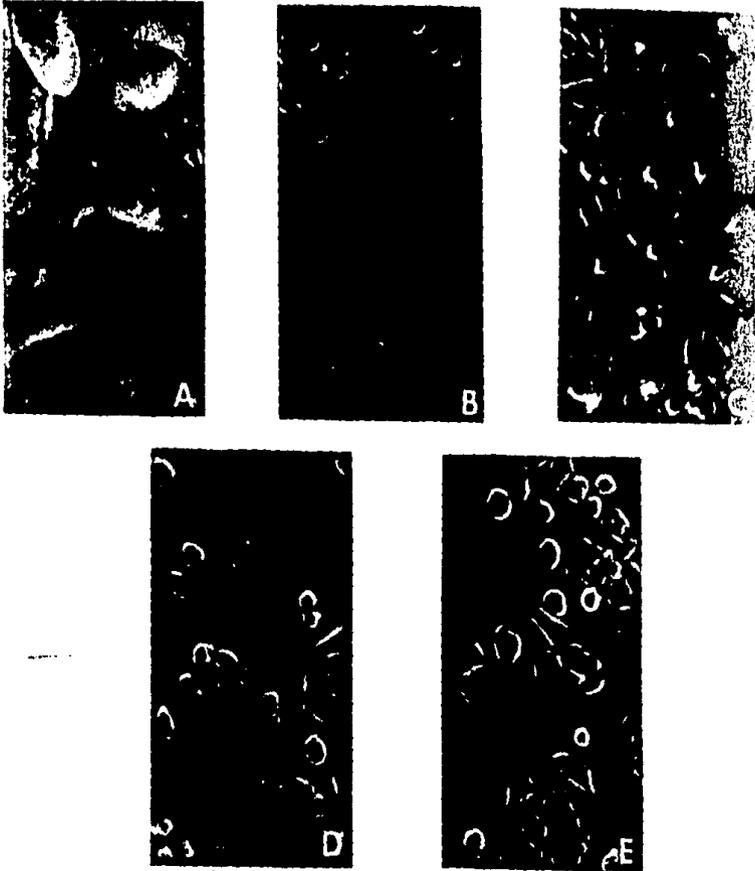


Fig.17. Efecto del tratamiento hipertérmico sobre el cultivo de células HeLa. Los cultivos fueron tratados a 42°C . A control, B choque t por 5 min, C choque t por 15 min, D choque t por 30 min, E choque t por 60 min. A aumento de 40X, B,C,D y E aumento de 20X.

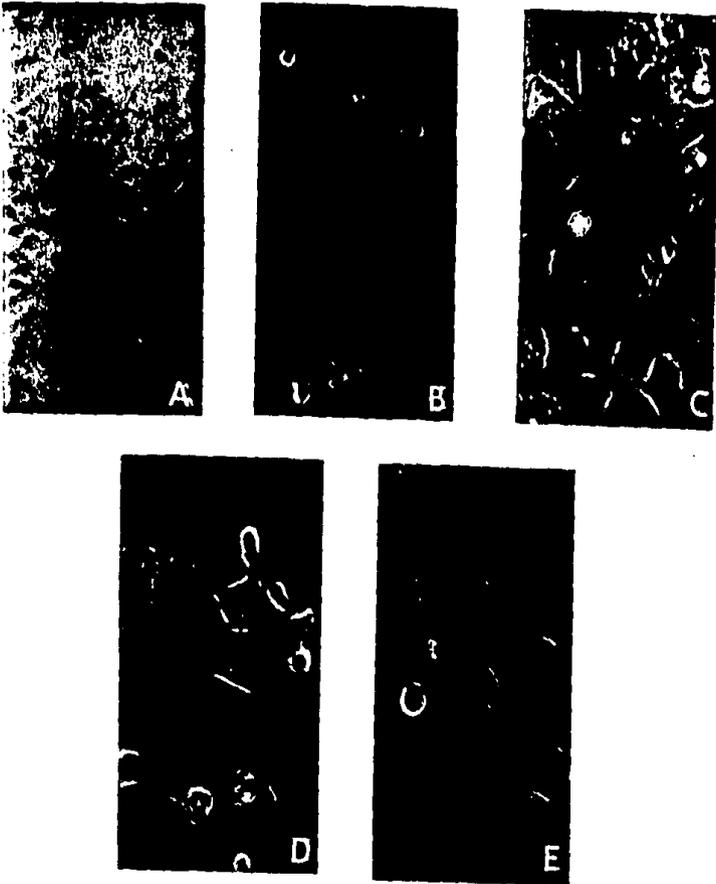


Fig.18. Efecto del tratamiento hipertérmico sobre el cultivo de células CVIP. Los cultivos se colocaron en tratamiento hipertérmico a 45 C. A control, B Choque por 5 min, C choque por 15 min, D choque por 30 min, E choque por 60 min.

Aumento de 20X.

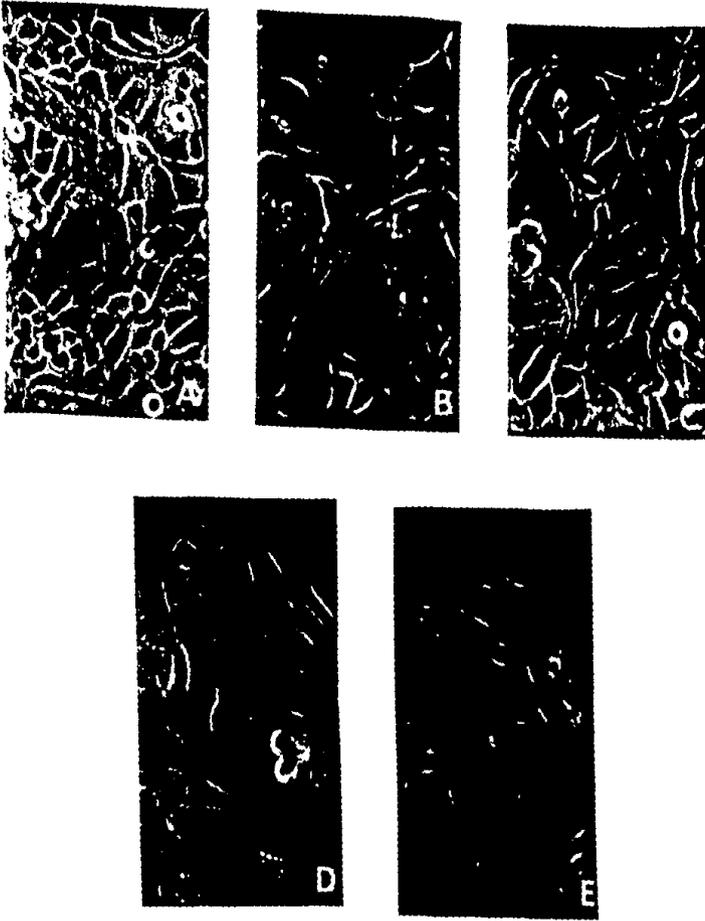


Fig. 19. Efecto del tratamiento hipertérmico sobre el cultivo de células PK15. Los cultivos se colocaron en un baño a 45°C. A control, B choque t por 5 min, C choque t por 15 min, D choque t por 30 min, E choque t por 60 min.

Aumento de 20X.

Las células CV1P de riñón de mono fueron expuestas al choque térmico por 5,15,30 y 60 minutos; el resultado muestra (fig.18) la continuidad de la monocapa en el control y la aparición de espacios en ésta a partir de los 15 minutos de choque térmico (c) ; se aprecia el aumento de células muertas conforme va en aumento el tiempo del choque; estas células comienzan a tener alteraciones en su morfología a los 5 minutos de tratamiento (b) notándose núcleos muy cercanos y membranas dañadas, ya en esta etapa aparecen de manera poco notable las células con dos núcleos en el mismo citoplasma, fenómeno llamado "formación de sincitios" que se presenta cuando estas células son infectadas con el virus del SOA (síndrome del ojo azul) infección que también es considerada situación de estrés (Francisco Domínguez, 1993) .Estos sincitios se aprecian más notablemente a los 15 minutos de tratamiento; La pérdida de la morfología es patente a los 30 minutos de choque apreciándose la aparición de las estructuras alargadas que salen del citoplasma. Estas células son drásticamente dañadas por el choque térmico y sufren pérdida de viabilidad hasta en un 100%.

Por último se expusieron las células PK15, de riñón de cerdo, al tratamiento hipertérmico por 5, 15, 30 y 60 minutos; en el resultado se muestra (fig.19) la continuidad de la monocapa hasta los 30 minutos de tratamiento (d) , continuidad que no es conservada a los 60 minutos de tratamiento (e); los espacios en la monocapa se notan hasta los 60 minutos del choque; el fenómeno de formación de sincitios aparece a los 5 minutos de choque y las alteraciones de la morfología comienzan hasta los 60 minutos de choque térmico. Es poco el porcentaje de células muertas con respecto a los resultados anteriores y el alargamiento de las células también comienza a los 60 minutos. Estas células fueron las más resistentes al calor y su viabilidad solo decreció en un 60%.

Tratamiento de choque térmico con tiempo de recuperación a 37°C.

A todos los cultivos se les colocó a 37°C después del choque térmico, los resultados muestran lo siguiente: Los cultivos no recuperan su morfología, las células tienen la misma morfología que presentaban después del choque térmico, a los 30 y 60 minutos de tratamiento el daño a nivel de estructura proteicas, de membrana plasmática, es irreversible; las estructuras parecidas a pseudópodos que salen del citoplasma no desaparecen durante el tiempo de recuperación y se observa que en general los cultivos celulares no tienden a la normalidad morfológica sino al contrario además de las deformaciones que presentan las células, su viabilidad baja del 30% al 100% en las células CVIP y HeLa (fig. 20, 21) o bien conservan la viabilidad sin recuperar la forma celular original como las células PK15, fig.22).

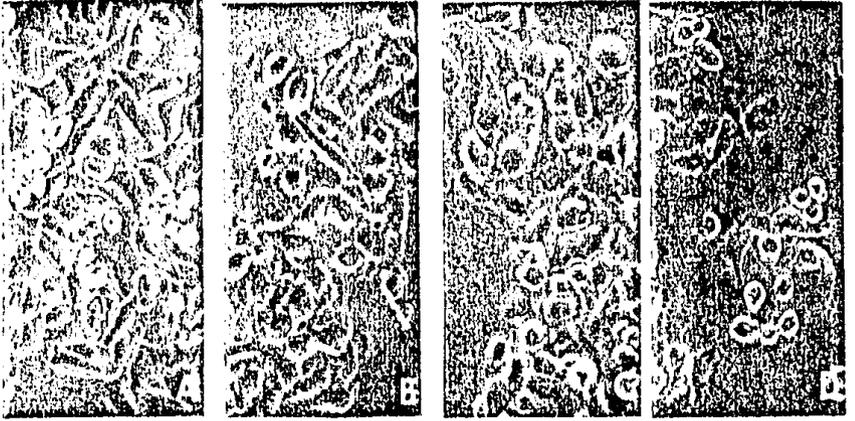


Fig. 20. Cultivo de células HeLa con tiempo de recuperación. Los cultivos, después del tratamiento hipertérmico, fueron colocados por 2 horas a temperatura de cultivo. A, 5 min de choque t. B, 15 min de choque t. C, 30 min de choque t. D, 60 min de choque t. Aumento de 20X.

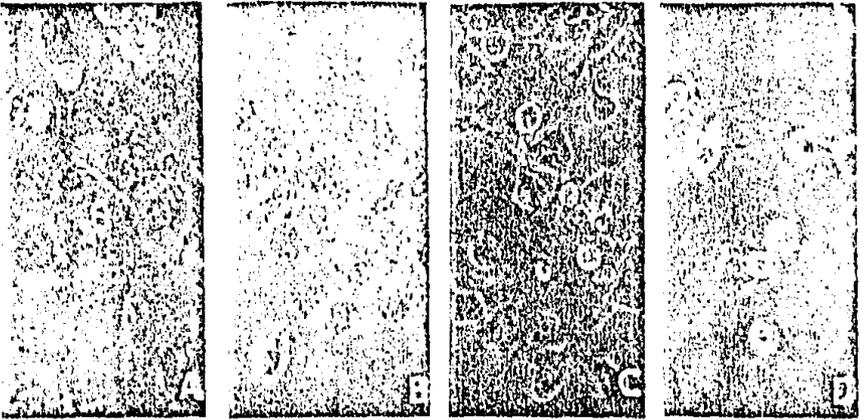


Fig. 21. Cultivo de células CVIP con tiempo de recuperación. Los cultivos, después del tratamiento hipertérmico, fueron colocados por 2 horas a temperatura de cultivo. A, 5 min de choque t. B, 15 min de choque t. C, 30 min de choque t. D, 60 min de choque t. Aumento de 20X.

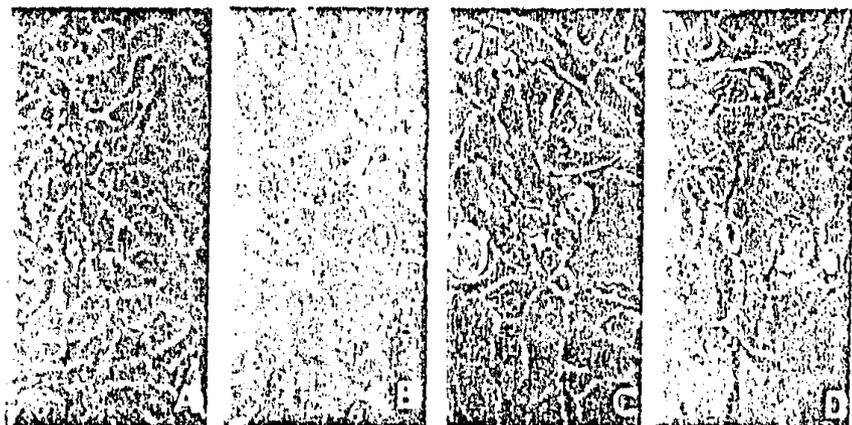
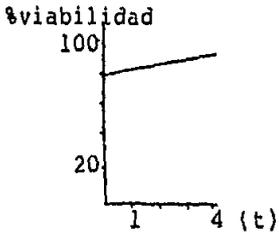
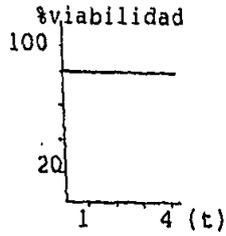


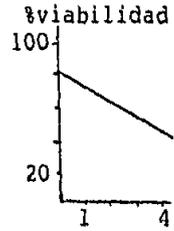
Fig. 22. Cultivo de células PK15 con tiempo de recuperación. Los cultivos, después del tratamiento hipertérmico, fueron colocados a 37°C. Los tiempos del choque térmico fueron: A, 5 min. B, 15 min. C, 30 min. D, 60 min. Aumento de 20X.



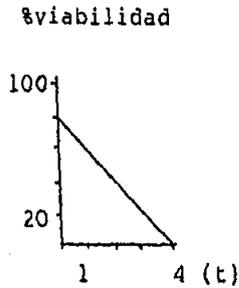
a)



b)



c)



d)

Gráfica . Viabilidad de los cultivos después del choque térmico. El cultivo de células CV1P fue colocado, después del choque térmico, a temperatura de cultivo y se observó al microscopio para calcular el por ciento de viabilidad durante los 4 días siguientes. a) 5 min de choque t. b) 15 min de choque térmico. c) 30 min de choque t. d) 60 min de choque t.

DISCUSION.

ESTABILIDAD DE LA RNA POLIMERASA IIO, SUBUNIDAD IIO.

Las proteínas son las moléculas orgánicas más abundantes en la célula, se encuentran en todos los componentes de cada célula ya que son fundamentales en todos los aspectos de su estructura y función (Alworth, 1972). Cada tipo de molécula proteica posee en su estado nativo una forma tridimensional característica que es conocida como su conformación (el término conformación se refiere a la ordenación espacial de los grupos sustituyentes que son libres de adoptar posiciones diferentes sin que se produzca ruptura de enlaces, debido a la posibilidad de rotación alrededor de los enlaces). Las proteínas globulares están constituidas por cadenas polipeptídicas plegadas estrechamente de forma que adoptan formas esférica o globulares compactas; casi todas las enzimas son proteínas globulares como los anticuerpos y las hormonas. La estructura terciaria se refiere al modo como la cadena polipeptídica se curva o se pliega para formar la estructura estrechamente plegada y compacta de las proteínas globulares (Haschemeyer, 1973). La estructura cuaternaria pone de manifiesto como se disponen en el espacio las cadenas individuales polipeptídicas de una proteína que posee más de una cadena por lo tanto el término más general de conformación se emplea para referirse a la estructura combinada secundaria, terciaria y cuaternaria de una proteína (Moore y Stein, 1973). Muchas moléculas proteicas solo relenen su actividad biológica dentro de una fluctuación muy limitada de temperatura y pH. La exposición de proteínas solubles o globulares a pH extremos o a temperaturas elevadas, les hace experimentar un cambio conocido como desnaturalización, el efecto más visible es el descenso de su solubilidad. Puesto que los enlaces químicos covalentes del esqueleto peptídico de las proteínas no se rompe durante este tratamiento se ha llegado a la conclusión que la estructura primaria permanece intacta. La mayor parte de las proteínas globulares se desnaturalizan cuando se incrementa la temperatura a 60°-70°C. La consecuencia más importante de la desnaturalización es que las enzimas globulares pierden su actividad biológica característica como la capacidad catalítica.

Las enzimas son una clase muy amplia de proteínas que tienen una función biológica específica, cada tipo de enzima tienen un centro activo al que se une su estrato específico durante el ciclo catalítico (Haschemeyer y Haschemeyer, 1973). El análisis por rayos X de algunas proteínas globulares muestra que cada tipo de proteína tiene un modo diferente de plegarse o sea una estructura terciaria distinta. La mayor parte de las proteínas globulares comparten tres características comunes: 1) un plegamiento compacto con poco o ningún espacio para las moléculas de agua, 2) una localización exterior de todos los grupos hidrofílicos, 3) una localización interior de los grupos hidrofóbicos (Tandford, 1973). Una vez formada la estructura terciaria de una proteína globular o enzima cooperan en su estabilización cuatro tipos

de interacciones: 1) los enlaces de hidrógeno entre grupos peptídicos, 2) los puentes de hidrógeno entre grupos; 3) las interacciones hidrofóbicas entre grupos no polares y 4) los enlaces iónicos entre grupos cargados positiva o negativamente tales como el $-COO^-$ y el $-NH_3^+$ (Jenks, 1973).

Un importante atributo de las enzimas es su enorme poder catalítico, y a pesar de ser moléculas relativamente frágiles, desarrollan sus funciones catalíticas en disoluciones acuosas diluidas a pH biológico y a temperatura de cultivo (Kirsch, 1973).

La RNA polimerasa es una enzima que transcribe DNA a RNA por medio de un mecanismo complejo de transcripción que involucra 7 factores generales que cooperan con la polimerasa para que lleve a cabo su función (Chambon, 1975). La síntesis de RNA es dependiente de la presencia de un catión divalente como el magnesio (Mg^{++}) o el manganeso (Mn^{++}). La dependencia de los metales de la reacción es debida presumiblemente a que el requerimiento de unir los sustratos nucleótidos como si fueran metales quelantes. Los alcoholes polihídricos, tales como el glicerol y el etilenglicol estimulan varias veces la actividad "in vitro" de la polimerasa (Dyran y Burgess, 1979) y podría involucrar una estabilización de la estructura de la enzima. En algunos casos los iones metálicos en glicerol poco puro causa una inhibición de la actividad de la polimerasa y esto puede ser evitado mediante el incremento de la concentración de EDTA (Blair, 1977). La contaminación con proteasas también afecta la estabilidad y la actividad de la RNA polimerasa, la incubación de RNA polimerasa II purificada de germen de trigo con polimerasa nativa de feno de ternera resulta en un rompimiento de las subunidades más grandes de la enzima que genera polipéptidos de pesos moleculares pequeños (Jendrisak, 1978).

Las proteasas, que pueden contaminar a la polimerasa, son inactivadas por medio de hervir las muestras en presencia de SDS y un agente reductor como el β -Me en la inmunodetección de la enzima por electroforesis en gel de poliacrilamida; muchas proteasas son activas en soluciones SDS a temperatura ambiente (25°C). El SDS aumenta dramáticamente la proporción de degradación proteolítica de la mayoría de las proteínas, presumiblemente porque este detergente rompe la estructura terciaria, dando sitios potenciales de ruptura que son más accesibles para las proteasas (Pringle, 1970). Kedingger y col. (1974) reportaron que ni el añejamiento deliberado del extracto crudo ni el uso del inhibidor de proteasas PMSF tienen algún efecto sobre las cantidades relativas de las diferentes formas de la enzima, así que la heterogeneidad no es debida a la proteólisis limitada durante el aislamiento de la enzima. Inversamente, en levaduras el uso de PMSF y el cuidadoso control del pH del extracto o lisado minimizan la activación de las proteasas (Dezelee y cols. 1976) para obtener las especies más grandes de la polimerasa sin rastros de degradación. La presencia de una proteólisis y una desestabilización al trabajar con la enzima, han sido las bases de toda una

línea de Investigación (Hodo y Blattl. 1977), D'Alessio y cols. 1979, Smith y Braun. 1978, Gullfoyle. 1980, Malcolm 1980). Como lo reportó Dezeloe y cols en 1976, las proteasas presentes en extractos crudos pueden hacer complejos con los inhibidores que no son removidos hasta los últimos estados de purificación. Así que la incubación de los extractos crudos no pueden aumentar "in vitro" la proteólisis. Más aún debe recordarse que de las 5 clases de proteasas (Walsh. 1975) solo una es sensitiva al PMSF. La estabilidad y la actividad catalítica de la enzima es sumamente frágil reportándose trabajos (Harding y Beychok. 1974) en los cuales se desestabiliza y desnaturaliza a la polimerasa obteniéndose la pérdida total de la actividad y el daño irreversible en la estructura terciaria de la enzima. Los primeros intentos de solubilizar y purificar la RNA polimerasa de una gran variedad de tejidos diferentes (Jacobs. 1973) han fallado debido a la baja recuperación de la enzima soluble y a la inestabilidad que presenta la polimerasa en los subsiguientes pasos de purificación. Se han propuesto tres tipos de métodos desde 1970 que han resultado en más altos rendimientos de enzima solubilizada a partir de varios tejidos, solo el primero interesa para los fines de este trabajo: la homogenización del tejido total, homogenización e incubación de las células, nucleos o nucleolos en amortiguadores adecuados en diferentes tiempos ya sea a 4°C o a 37°C (Stein y Hausen. 1970 Bagshaw y Mall. 1971, Chesterlon y Butterworth. 1971a,b, Furlh y cols. 1970, Mertelsmann. 1969, Golberg y Moon. 1970, Sugden y Keller 1973). Estos trabajos sentaron las bases para la subsiguiente investigación de Kim y Dahmus (1986) de Rangel y col. (1987) y Rangel y cols. (1988). Todos ellos reportaron condiciones en que la enzima sufría ciertos cambios, proteólisis y desestabilización por proteasas, por infección con virus, etc.

Los resultados presentados en este trabajo nos indican que :a) las proteasas presentes en el lisado total parecen afectar de alguna manera a la polimerasa y a su estabilidad y si se prepara el amortiguador de estabilidad con un inhibidor de proteasas es para evitar y descartar la acción de estas proteasas; b) podría decirse que la RNA polimerasa conserva su estabilidad ya que la tendencia de la enzima es comportarse de manera similar al control y no permitir una desestabilización al conservar su forma I o intacta y nunca pasar a la forma IIa (Kim .1986) que tiene el dominio carboxi-terminal sin fosforilar. Las evidencias apuntan a que el amortiguador de estabilidad efectivamente estabiliza a la enzima dejando fosforilado el DCT y no permitiendo la proteólisis en las condiciones de temperatura de 4° C y 25°C. c) el aumento de movilidad electroforética que muestra la enzima marcadamente en la condición de temperatura a 25°C por 8 horas, 24 y 48 horas se debe muy probablemente a que la conformación de la enzima, una proteína globular sufre una desestabilización al perder algunos de sus interacciones hidrofóbicas entre grupos no polares que al separarse de la molécula permiten que ésta se desplace en la malla de acrilamida. La enzima durante el tratamiento con el amortiguador de estabilidad parece no perder su DCT ya que el anticuerpo fué preparado para reconocer mayormente dominio

fosforilado como lo reporta Kim y Dahmus (1986) aunque también pueda reconocer menormente la forma IIa ésta nunca llega a presentarse en los lisados estabilizados que contienen a la enzima RNA polimerasa II de células HeLa como producto de una proteólisis limitada a causa de proteasas pero la temperatura de 4°C, en los tiempos de 48 horas, a la temperatura de 25°C, en los tiempos de 24 horas y 48 horas en la condición de estabilidad, aparece una banda que podría indicarnos que la estructura está perdiendo estabilidad y en la cual está involucrada la desfosforilación del DCT. Esta banda protéica podría explicarse como la desestabilización de algunas moléculas protéicas de polimerasa que al perder parte de sus grupos fosfatos de este dominio no llegan a definirse ni como IIa ni como IIb y bajan en la mancha de acríamida hasta los 200 Kd.

A la temperatura de 37°C y bajo las condiciones de degradación, con la inclusión de agentes reductores como el β -Me, se encuentra la mayor desestabilidad que sufre la polimerasa en estas condiciones de degradación y estabilidad. La polimerasa pierde la estructura que es reconocida por el anticuerpo, esto probablemente se debe a que: a) la enzima ha perdido la estabilidad de su conformación y ha sufrido un proceso de desnaturalización e inestabilidad de las uniones iónicas entre los grupos cargados debido a la donación de cargas adicionales que proporciona el agente reductor (Jendrisak, 1978); o b) la polimerasa ha perdido el epítipo que permite al anticuerpo reconocerla, ya sea por lo que se acaba de discutir, desnaturalización, o bien que los enlaces de unión entre los aminoácidos tyr, ser, pro, y tre se hayan de tal manera inestabilizados que el DCT se pierde siendo entonces imposible que el anticuerpo reconozca esa parte de la molécula que se ha degradado.

Los factores que de alguna manera afectan a la enzima RNA polimerasa II o subunidad IIa en las condiciones de degradación son: proteasas que hidrolizan los enlaces peptídicos, el agente reductor (β -Me) que dan cargas adicionales y la temperatura que afecta de manera directamente proporcional a la enzima, a la elevación de temperatura corresponde a un grado de desnaturalización. La manera como estos factores afectan a la enzima ya sea por proteólisis limitada, desestabilización conformacional por exceso de cargas o la desnaturalización de la estructura terciaria, hacen que el anticuerpo sea incapaz de reconocer a la enzima a 37°C.

CHOQUE TERMICO.

La respuesta choque térmico es la respuesta generalizada que presentan todos los organismos a nivel celular ante las situaciones de estrés que ocurren en el medio (Craig, 1985, Taguchi, 1993). La respuesta se origina a nivel transcripcional (McKnight, 1986) e involucra promotores, factores y a la RNA polimerasa II. Existen módulos en los promotores que identifican un grupo particular de genes que son llamados los elementos de respuesta, ejemplos de estos son los elementos de la respuesta choque térmico ECHT, los elementos de la respuesta glucocorticoides

ERG, elementos de la respuesta metal ERM. Estos elementos de respuesta son reconocidas por los factores que coordinan la transcripción de un grupo particular de genes. Estos elementos tienen las mismas características de los módulos de otros promotores o activadores, pueden contener secuencias consenso cortas que pueden ser reconocidas en los promotores adecuados, están presentes en la región de -200pb corriente arriba del punto de inicio y generalmente se presentan en múltiples copias; el ECHT se encuentra en un promotor particularmente en los promotores de choque térmico a -15pb del punto de inicio. El ECHT es reconocido por un factor de transcripción, el factor de transcripción de choque térmico FTCHT, el cual es activo solo en células estresadas; este se une a un sitio que incluye la secuencia consenso CNGGAANNTCCNNG. El FTCHT se une cooperativamente a elementos de la respuesta adyacente protegiendo o cubriendo aproximadamente 27 pb (McKnight y Tjian, 1986). El FTCHT de levadura llega a ser fosforilado cuando las células son tratadas con hipertermia. El FTCHT tiene cierta función a temperatura normal, ya que el gene que codifica es esencial bajo todas las condiciones es posible que sea requerido para los niveles basales de transcripción de genes *ch 1* a temperaturas bajas (Guarente, 1987) y son activados por fosforilación para garantizar el incremento de la transcripción a temperaturas más altas.

Las proteínas *ch 1* son inducidas por una gran variedad de agentes y que tienen como efecto común un cambio en la oxidación (Ashburner y Bonner, 1979, Boucchner y Ames, 1982) y una acumulación de nucleótidos adenilados. Dos de los inductores universales de la respuesta choque térmico, el calor y el etanol pueden causar daño a la membrana, resultando en una interferencia con el transporte de electrones (Craig, 1985).

En 1986, Pelham propone que las *pcht 70* tienen como una de sus funciones reparar prerribosomas dañados; propone que durante el *ch 1* las proteínas llegan a ser parcialmente desnaturalizadas exponiendo sus regiones hidrofóbicas las cuales interactúan para formar agregados insolubles. Por medio de la unión a las superficies hidrofóbicas la *pcht 70* limita tales interacciones y promueve la disgregación, entonces usa la energía de la hidrólisis del ATP para liberarse a sí misma del sustrato sufriendo un cambio conformacional en el proceso. Este reporte sienta las bases para subsecuentes investigaciones. En 1993 Taguchi y Yoshida proponen un modelo parecido pero más complicado: las chaperoninas son *pcht*, estas no se desnaturalizan y son estables hasta más arriba de 80°C. El estudio previo de Taguchi (1991) y este reporte sobre la función de las chaperoninas sugieren que la chaperona se une a un intermediario proteico plegable que se origina durante la desnaturalización parcial de las proteínas nativas estresadas y el complejo entre la chaperonina y las proteínas parcialmente desnaturalizadas (intermediarios proteicos plegables IPP³) es estable en ausencia de MgATP, ya que si está presente el IPP³ aprovecha la hidrólisis del ATP para liberarse del complejo. La chaperonina captura a los IPP³ que pueden plegarse conformacionalmente con la ayuda del

MgATP; una vez capturado, el IPP es protegido de la desnaturalización irreversible hasta que la chaperonina misma es colapsada por el calor. Las chaperoninas protegen a los IPP, es decir a las proteínas parcialmente desnaturalizadas, pero no a las proteínas nativas, lo cual nos lleva a postular que al producirse la respuesta de choque térmico, las proteínas al desnaturalizarse y exponer sus áreas hidrofóbicas se convierten en IPP que a su vez son capturadas por las chaperoninas sintetizadas formando un complejo chaperonina-IPP que resiste altas temperaturas, después de lo cual se usa la energía del ATP para liberar el complejo.

De acuerdo a lo anterior, los resultados muestran que cuando se da un choque térmico de 5 y 15 min, hay una desestabilización que se refleja en: la respuesta de choque térmico que se origina a nivel transcripcional (Craig, 1985), desnaturalización parcial de las proteínas nativas; al darse el choque térmico la cantidad basal de chaperoninas protege una porción limitada de moléculas de polimerasa, las cuales siguen siendo reconocidas por el anticuerpo, esto parece indicarnos que la polimerasa protegida ha sintetizado nuevas moléculas de enzima y de chaperonas que forman complejos de protección y al aumentar el número de moléculas al llegar al tiempo de 60 min de choque térmico, el anticuerpo reconoce a la enzima siendo notoria el aumento de la misma.

Lo anteriormente propuesto se verifica en el siguiente experimento, en el cual se da un choque térmico durante 1, 2, 3, 4 y 5 horas. La banda proteica de 240 Kd perteneciente a la RNA polimerasa II permanece estable durante estos periodos de tratamiento hipotérmico debido a que probablemente los complejos chaperonina-polimerasa se hayan estabilizados y las chaperoninas estén protegiendo funcional y estructuralmente a la polimerasa. Después del choque térmico se puede decir que el complejo se libera a sí mismo utilizando la energía de la hidrólisis de ATP sufriendo el complejo un cambio conformacional, que hace las uniones hidrofóbicas más débiles (Pelham, 1986, Taguchi, 1993).

Cuando se le da a la célula un tiempo de recuperación a 37°C la enzima deja de ser reconocida por el anticuerpo (en los primeros tiempos de choque, 5 y 15 min), lo cual puede deberse a que la estructura terciaria de la enzima y su conformación han empezado a sufrir cambios después de que el complejo ha sido liberado y disuelto al dejar la célula de estar en la situación de estrés. Las enzimas retienen su actividad biológica dentro de una fluctuación muy limitada de pH (Lentner, 1974), la exposición de esta proteína globular a diferentes pH les hace experimentar la desnaturalización. Después del choque térmico y sin la protección de las chaperoninas, la RNA polimerasa sufre de desnaturalización parcial debido a que el medio en que se encuentra la célula ha sufrido cambios en el pH y en la cantidad de electrolitos libres; por lo que parece que la enzima comienza a tener rupturas a nivel de estructura terciaria debilitándose los enlaces que interactúan para sostener esta conformación. La variación del pH tal vez sea el resultado de un incremento en la vaporización del agua del medio después del choque lo que conlleva a un decremento de iones H⁺. Posiblemente los metales Mg²⁺ y Mn²⁺

son utilizados para la reparación de otras estructuras proteicas; la dependencia de los metales que presenta la polimerasa es debida presumiblemente a el requerimiento de unir los sustratos nucleótidos como si fueran metales quelante, esto nos indica que al ausentarse estos metales la polimerasa pierde parte de su actividad ya que no cuenta con los requerimientos mínimos para su funcionamiento.

Ya sea que las chaperoninas protegan a la enzima o que la vaporización del agua, el decremento de los iones H y de otros iones libres, el cambio del pH, la ausencia de los requerimientos de los metales, el decremento lento de la temperatura o bien los procesos de reparación de grandes conglomerados de proteínas empobreciendo el medio celular, ya sea uno o varios en conjunto, estos son los factores que afectan de manera dramática a la polimerasa y a su estabilidad, en los tiempos de 2, y 24 horas de recuperación a 37°C.

MORFOLOGIA CELULAR ANTE EL CHOQUE TERMICO.

La membrana plasmática de todas las células eucarióticas tienen una estructura general: está compuesta de moléculas lipídicas y proteínas mantenidas juntas principalmente por Interacciones no covalentes (Repasky ,1992).El esqueleto de la membrana es un componente de una malla compleja de proteínas estructurales relativamente insolubles a detergentes que se conocen como citoesqueleto. El citoplasma de las células eucarióticas contiene al menos 3 clases de proteínas de fibra larga incluyendo microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedarios; además hay un buen número de pequeñas proteínas asociadas que son esenciales para la función del citoesqueleto. Este sistema de proteínas, el cual dá soporte estructural al citoplasma y a varios organelos, también sirve para ayudar a mantener la forma de la célula, la movilidad y la organización del citoplasma, el llamado citoesqueleto transcelular (Yu y cols. 1973). La membrana plasmática asociada al citoesqueleto es la asociación de elementos del sistema filamentosos transcelular con la bicapa lipídica; el esqueleto de la membrana plasmática se refiere al grupo de proteínas citoesqueléticas que están limitadas en su distribución subcelular a una zona subyacente a la superficie interior de la bicapa lipídica. Este grupo de proteínas, parecen funcionar solo en la membrana plasmática manteniendo su organización, elasticidad e integridad (Yu y cols. 1973,Sheetz y Sawyer. 1978), el esqueleto de la membrana está involucrado activamente en una gran variedad de actividades celulares, incluyendo la activación y diferenciación, manteniendo la morfología, el mantenimiento de la polaridad de la célula, la interacción con la matriz extracelular y la exocitosis. Las proteínas Integrales de la membrana, las cuales dan sitios de anclaje para las estructuras del citoesqueleto tienen movilidad limitada (difusión de las proteínas para generar un modelo fluido de la estructura de la membrana). La alteración de estos sitios de fijación podría en turno incrementar la movilidad, estas mediciones del movimiento ofrecen un método para investigar

las interacciones membrana-citoesqueleto. El citoesqueleto del eritrocito humano, consiste de una red de proteínas periféricas las cuales controlan la forma de la célula y suministran la fuerza mecánica para mantener esta forma (Bennet, 1989).

Cuando las células reciben un tratamiento como el de choque térmico, la célula en su totalidad sufre la condición de estrés desestabilizándose y sufriendo toda una serie de alteraciones que van a afectar a los cultivos a diferentes niveles (Ceccaini, 1971). La respuesta choque térmico tienen origen a nivel transcripcional parando la expresión de los genes de mantenimiento y los genes normales e incrementando la síntesis de pcht, las llamadas chaperoninas (Lindquist y Craig, 1988), que actúan evitando la desnaturalización total de los conglomerados proteicos vitales (Pelham, 1986, Taguchi, 1993). Pero aunque se dé respuesta transcripcional al estrés, la célula como un todo expone cada uno de sus componentes: compartimientos, membranas y organelos, al choque t y como un todo también es afectada por el incremento de la temperatura en estos componentes.

En los resultados obtenidos en este trabajo, los cultivos celulares fueron alterados por el tratamiento hipertérmico, resultando de esta alteración un decremento notorio en su viabilidad y un marcado cambio en la morfología celular. Los cultivos de células transformadas PK15 (Dominguez, 1993) fueron la línea celular que lograron resistir la condición de estrés y mantuvieron su viabilidad a pesar de que la morfología celular no logró recuperar su forma original. Las células transformadas CV-1P, no resistieron a la condición de estrés y los daños causados en su maquinaria celular y en su morfología, fueron irreversibles. Los cultivos celulares cancerosos (HeLa) resistieron el choque térmico durante cierto tiempo pero después de un tiempo prolongado de tratamiento (60 min) los daños sufridos también fueron irreversibles.

Estos resultados pueden ser la consecuencia de los cambios, por el incremento de la temperatura, de 3 parámetros:

1) El suero y el Medio. El suero y el medio contienen un complejo de nutrientes, aminoácidos como la A, vitaminas (biotina, ac. ascórbico, ac. fólico, ac. nicotínico, ac. pantoténico, etc) sales inorgánicas (NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂) y factores adicionales de crecimiento como glucosa, glutamina, inositol, etc., todos estos dializables, nutrientes y a.a que se descomponen a temperaturas altas, además el suero contiene lipoproteínas que son desnaturalizadas al elevarse la temperatura. Y si las proteínas del suero hacen a las sustancias hidrofóbicas más solubles en la solución acuosa, ya que la célula utiliza los lípidos unidos a las proteínas del suero, al quedar éstas desnaturalizadas, se impide la utilización de estos lípidos y de todas las moléculas lábiles que se encuentran en el medio. El suero contiene gran número de enzimas, como la arginasa y la oxidasa, que pueden crear a lo largo del tratamiento hipertérmico sustancias tóxicas inutilizables para la célula.

2) pH. Además de los nutrientes, el medio de cultivo debe proporcionar condiciones fisicoquímicas adecuadas, estos parámetros son importantes para el crecimiento celular e incluyen la molaridad, el pH y la presión de dióxido de carbono. El rango de pH óptimo para los cultivos es muy estrecho para las diferentes células el rango es de 7.30 - 0.15 y para embriofibroblastos de pollo es de 7.12 - 0.18. La presión de dióxido de carbono tiene una directa interrelación con el pH, el uso del 2 al 5% de CO₂ es benéfico para evitar el cambio en el pH cuando los cultivos son removidos de la incubadora. Cuando los cultivos son retirados de la incubadora, deja de existir la presión del CO₂, que trabaja como un amortiguador (tampon) y consecuentemente hay un desequilibrio del pH del medio pero si además de esto se suma el tratamiento hipertérmico y la elevación de temperatura en el medio (y la evaporación del agua del medio) el cambio de pH es aún más drástico afectando de manera notoria a la viabilidad celular.

3) La membrana plasmática. La membrana de las células tiene como estructura básica una doble capa de fosfolípidos. Una de las principales propiedades de la bicapa es la de impermeabilidad a ciertas sustancias y permeabilidad al agua. Otra de las propiedades de la membrana es la de la elasticidad, la elasticidad de la membrana se debe a que las cadenas de átomos de carbono de los fosfolípidos que se encuentran en el centro de la doble capa se comportan como las moléculas de cadenas libres y tienen gran movilidad. Esta fluidez o estado físico de las membranas depende de la temperatura. Las membranas no solo contienen lípidos, hay también carbohidratos y proteínas en proporciones variables; sin embargo las funciones activas de la membrana parecen estar a cargo de las proteínas como en el caso del transporte activo y pasivo (Peña, 1986). Cuando el choque se da por 30 min, la morfología de la célula cambia, esto nos indica que probablemente las proteínas del citoesqueleto han comenzado a desnaturalizarse y la red que proporciona al sosten de la forma celular está desintegrándose; la fluidez de la bicapa de la membrana plasmática ha aumentado por el incremento de la temperatura y esta misma fluidez permite que la forma original cambie (Peña, 1986) con la aparición de protuberancias del citoplasma que al no contar con el apoyo mecánico de la red citoesquelética tienden a extenderse sobre la superficie de contacto. Después del choque térmico y de colocar los cultivos durante cierto periodo de tiempo a temperatura de cultivo, la morfología y la viabilidad no son recuperadas, estas evidencias apuntan a que la desnaturalización de las proteínas de la membrana y que se encargan del transporte activo y pasivo, el empobrecimiento del medio que puede contener sustancias tóxicas para la célula, así como el decremento en la presión de dióxido de carbono y el consecuente cambio en el pH causan un daño irreversible en la morfología y en la viabilidad de los cultivos celulares.

CONCLUSION.

- 1.- La enzima RNA polimerasa II0 , en la subunidad Ilo, en las condiciones de estabilización y a temperaturas de 4°, 25° y 37°C conserva su estabilidad.
- 2.- La RNA polimerasa II0 , en la subunidad Ilo, en las condiciones de añejamiento se degrada y pierde su estabilidad a la temperatura de 37°C.
- 3.- El tratamiento de Choque térmico sí desestabiliza a la enzima RNA polimerasa II0, en la subunidad Ilo, a los 5 y 15 minutos del tratamiento.
- 4.- El tratamiento de Choque Térmico por 60 min no afecta la estabilidad de la enzima RNA polimerasa II0 subunidad Ilo.
- 5.- El tratamiento seguido de un tiempo de recuperación a 37°C no recupera a la enzima RNA polimerasa II0 ,subunidad Ilo, ni hace que se recupere su estabilidad.
- 6.- El tratamiento hipertérmico afecta de manera irreversible a la morfología de los cultivos eucariontes estudiados desde los 30 minutos en adelante.

LITERATURA CITADA.

1. Tapla , 1990 Tesis Doctorado.
2. Siebenlist . Simpson & Gilbert. Cell 20, 289-281,1980.
3. Von Hippel et al. Ann. Rev. Biochem.53,389-449 1984.
4. McClure. Ann.Rev.Biochem. 54, 171-204,1985.
5. Reznikoff et al. Ann.Rev.Genet. 19, 355-387,1985.
6. Corden et al. Science 209,1408-1414. 1981.
7. McKnight et al. Cell 25, 385-398,1981.
8. McKnight & Tjian. Cell 46, 795-805. 1986.
9. Chamberlin, M.J. 1976. RNA polimerase, ed. R. Losick M. Chamberlin, pp 17-67 Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Lab 899 pp.
10. Yura, T., Ishihama , A. 1979 .Annu. Rev.Genet. 13:59-97
11. Chamberlin M.J. 1982. Enzymes. 15:61-86
12. McClure, W.R. 1985 Annu. Rev. Biochem.54:171-204
13. Schleif, R.1988 Science 241 : 1182-87
14. Gralla, J. D.1989 Cell 57:57:193-95
15. Helmann, J.D. Chamberlin,M.J. 1988.Annu. Rev. Biochem 57:839-72
16. Platt,T 1986 Annu. Rev. Biochem. 55:339-72
17. Bell, S.P. Learned,R.M. , Jantzen H.M.,Tjian,R. 1988. Science 241:11192-97
18. Guarente,L.1987.Annu. Rev. Genet. 21:425-52
19. Johnson, P.F., McKnight, S.L 1989 Annu.Rev. Biochem 58:799-839
20. Struh, K. 1989 Annu.Rev. Biochem. 58:1051-77.
21. Woo Yeon Kim & Dahmus. Purification of RNA Polymerase II α from Claf Thymus. 1988 J. Biol. Chem. 263, No. 35 pp 1880-1885.
22. Kim & Dahmus. Immunochemical Analysis of Mammalian RNA Polymerase II Subspecies.J.Biol.Chem .261, No.30 .pp 14219-14225. 1986.
23. Laybourn & Dahmus. Transcription-dependent Structural Changes in the C-terminal Domain of Mammalian RNA polymerase Subunit II α . J.Biol.Chem. 264, No.12 pp 6693-6698. 1989.
24. Aheam, Bartolomei. West. Clsek and Corden. 1987.J.Biol.Chem. 262,10695-10705.
25. Allison. Wong. Fitzpatrick. Moyle and Ingles 1988. Mol. Cel.Biol. 8, 321-329.
26. Bartholomew. Dahmus and Meares. 1986 J.Biol.Chem. 261, 14226-14231.
27. Cadena. Dahmus. 1987. J.Biol.Chem. 262, 12468-12474.

28. Roeder R.G. 1976. RNA polymerase. R. Losick, M. Chamberlin, Eds, pp.285-329. Cold Spring Harbor New York.
29. Christman. Dahmus . Monoclonal Antibody Specific for Calf Thymus RNA Polymerase IIO and IIA. *J.Biol.Chem.* 256, 11798-11803. 1981.
30. Kedinger. Nuret and Chambon. Structural evidence for two-amanitin sensitive RNA polymerases in Calf Thymus. *FEBS Lett.* 15, 169-174. 1971.
31. Laemmli. Cleavage of structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature (Lond)* 227,680-685.1970.
32. D'Alessio. Perna. Paule. Dna-dependent RNA polymerase from *Acanthamoeba castellanii*. *J.Biol.Chem.* 254, 11282-11287. 1979.
33. Greenleaf. Haars. Bautz. In vitro Proteolysis of a large Subunit of *Drosophila Melanogaster* RNA Polymerase B. *FEBS Lett.* 71,205-208. 1978.
34. Jendrisak. Burgess. A new method for the large scale Purification of wheat Germ DNA-dependent RNA Polymerase II. *Biochemistry* 14. 4639-4645. 1975.
35. Hodo & Blattl. *Biochemistry* 16. 2334. 1977.
36. Allison, Moyle, Shales ,Ingles. *Cell* 42. 599-610.1985.
37. Sentenac. 1985. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 18 .31-90.
38. Towbin. Staehelin, Gordon .1979. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4350-4354.
39. Conaway. Conaway.1988 *J.Biol.Chem.* .283,2962-2968.
40. Corden. Cadena. Aheam. Dahmus.1985. *Proc. Natl. Sci. USA* 82, 7934-7938.
41. Dahmus.1981. *J.Biol:chem.* 256,3332-3339.
42. Dahmus. Kedinger. 1983.*J.Biol.Chem.* 258, 2303-2307.
43. Dahmus. Laybourn. Borrebaeck. 1988. *Mol.Immunol.* 25. 997-1003.
44. Dahmus. Bartholomew. Cadena. Dahmus. Kim. Laybourn. Payne. 1989. in NATO-ASI "Molecular mechanism and consequences of activation of hormone and growth factor receptors. (Sekeris, C.E.,ed) Kluwer Academic Publishers, in press.
45. Davison. Egly. Mulvihill. Chambon.1983 . *Nature* 301, 680-686.
46. Kim. Dahmus. 1989 *J.Biol.Chem.* 264, 3169-3176.
47. Nonet. Sweetser. Young. 1987. *Cell* 50. 909-915.
48. Sawadogo. Roeder 1984. *J.Biol.Chem.* 259. 5321-5326.
49. Sigler. 1988. *Nature* 333, 210-212.
50. Zehring. Lee. Weeks. Jokerst. Greenleaf. 1988 *Proc. Natl. Acad. USA* 85. 3698-3702.
51. Conner.Gamer. Miller. Boone. 1977. Prospects for hiperthermia in human cancer therapy. II. Implications of biological and physical data for application of hyperthermia to man. *Radiology.* 123, 497.

52. Dewey. Hopwood. Saporeto. Gerweck. 1977. Responses to combinations of hyperthermia and radiation. *Radiology* .123.483.
53. Har-kedar. Bleehen.1976.*Adv.Radiat. Biol.* 6, 229.
54. Miller. Connor. Heusenhueld.Boone. 1977. *Radiology.* 123,489.
55. Overgaard. Bichel.1977. *Radiat.Biol.* 123,511.
56. Rosenberg. Kemeny. Switzer. Hamilton. 1971. *Nature* 232, 471.
57. Sult. 1977 .*Radiology.* 123,483.
58. Henle. Dethlefsen. 1978. Heat fractionation and thermotolerance: a review. *Cancer.Res.* 38,1843.
59. Gerner. Boone. Connor. Hicks. Boone.1978. *Cancer Res.* 36. 1035.
60. Burdon. Slater. McMahon. Cato. 1982. *Br. J. Cancer.* 45.953.
61. Corces. Pellicor. Axel. Meselson. 1981. *Proc.Natl.Acad. Sci. USA* 78. 7038-42.
62. Pelham. Blenz.1982. ver sig. ref. 131, pp43-48.
63. Schlesinger. Ashburner. Tissieres. 1982. Heat Shock from bacteria to man. Cold. Spring Harbor, N.Y. Cold Spring Harbor Lab.440 pp.
67. Lis. Costlow.Banzie.Knipple. O'Connor. Sinclair.1982. Ver ref. 63. pp.57-62.
68. Mirault. Delwart. Southgate. 1982. a DNA sequence upstream of *Drosophila hsp 70* genes is essential for their heat induction in monkey cells. Ref. 63. pp35-42.
69. Pelham. 1986. Speculations on the functions of the Major Heat shock and glucose-regulated proteins. *Cell* .vol 46. 959-961.
70. Samuels. Sharp. 1986. Purification and characterization of a specific RNA polymerase II transcription factor. *J. Biol.Chem.* 261: 2003-2013. 1986.
71. Egly. Miyamoto. Moncollin. Chambon.*EMBO J.* 3.2363-2371.1984.
72. Reinberg. Roeder.. *J. Biol. Chem.* 262.3310-3321. 1987.
73. Zheng. Moncollin. Egly. Chambon. *Cell.* 50. 361-368.1987.
74. Conaway. Bond. Conaway. *J.Biol. Chem.* 262. 8293-8297. 1987.
75. Conaway. Conaway. *J.Biol.Chem.*264. 2357-2362.1989.
76. Burton. Killen. Sopla. Ortolan.Greenblatt. *Mol.Cell.Biol.* 8. 1602-1613.1988.
77. Flores. Maldonado. Burton. Greenblatt. Reinberg. *J. Biol. Chem.*263.10812-10816.1988.
78. Fire. Samuels. Sharp. *J. Biol. Chem.* 259. 2509-2516. 1984.
79. Bunick.Zandomeni.Ackerman. Weinmann. *Cell* 29. 877-886. 1982.
80. Rappaport. Wrinmann. *J. Biol. Chem.* 262. 17510-17515. 1987.
81. Zandomeni. Zandomeni. Shugar. Weinmann. *J.Biol.Chem.* 261. 3414-3419. 1986.
82. Sopla. Carthew. Greenblatt. *J.Biol.Chem.*260. 10353-10360. 1985.
83. Horikoshi. Hai. Lin. Green.Roeder .*Cell* 54. 1033-1042. 1988.

84. Ren. Garges. Adhya. Krakow. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85. 4138-4142. 1988.
85. Sekimizu. Nakanishi, Mizuno. Natori. Biochemistry 18. 1582-1588- 1979.
86. Rappaport. Reinberg. Zandomeni. Weinmann. J. Biol. Chem. 262. 5227-5232. 1987.
87. Rappaport. Cho. Saltzman. Prenger. Golomb. Weinmann. 1988.
88. Hirashima. Hlral. Nakanishi. Natori. J. Biol. Chem. 263. 3858-3863. 1988.
89. Weil. Luse. Segall. Roeder. Cell 18, 469 .1978.
90. Manley. Fire. Cano. Sharp. Geffer, PNAS 77, 3855. 1980.
- 91 Usheva. Maldonado. Goldring. Lu. Honbavi. Reinberg. Aloni, Cell 69, 871. 1992.
- 92 Zehring. Greenleaf, JBC 265, 8351. 1990.
- 93 Peterson. Kruger. Herskowitz, Cell 64, 1135. 1991.
94. Suzuki, Nature 344, 562. 1990.
95. Corden, Trends Blochem Sci 15, 383. 1990.
96. Laybourn. Dahmus, JBC 265, 13165. 1990.
97. Payne. Laybourn. Dahmus, JBC 264, 19621. 1989.
98. Lu. Flores. Weinmann. Reinberg, PNAS 88, 10004. 1991.
99. Lu. Zewel. Fisher. Egly. Reinberg, Nature (in press). 1992.
100. Reinberg. Horikoshi. Roeder, JBC 262, 3322. 1987.
101. Horikoshi. Yamamoto. Okhuma. Weil. Roeder, Cell 61, 1171. 1990.
102. Peterson. Tanese. Pugh. Tjian Science 248, 1625. 1990.
103. Hoey. Dynlacht. Peterson. Pugh. Tjian, Cell 61, 1179. 1990.
104. Buratowski. Zhou, Science 255, 1130. 1992.
105. Zhou. Schmldt. Berk, EMBO J. 10, 1843. 1991.
106. Dynlacht. Hoey. Tjian, Cell 66, 563. 1991.
107. Buratowski, Hahn, Guarente, Sharp. Cell 56, 549. 1989.
108. Maldonado. Ha. Cortes. Weis. Reinberg, MCB 10, 6335. 1990.
109. Cortes. Flores. Reinberg, MCB 12, 413. 1992.
110. Flores. Lu. Reinberg, JBC 267, 2786. 1992.
111. Ha. Lin. Shang. Green. Reinberg, observaciones no publicadas.
112. Flores. Maldonado. Burton. Greenblatt. Reinberg, JBC 263, 10812. 1988.
113. Flores. Ha. Reinberg, JBC 265, 5629. 1990.
114. Bengal. Flores. Krauskopf. Reinberg. Aloni, MCB 11, 1195. 1991.
115. Flores. Lu. Killeen. Greenblatt. Burton. Reinberg, PNAS 88, 9999. 1991.
116. Okhuma. Sumimoto. Horikoshi. Roeder, PNAS 87, 9163. 1990.
117. Inostroza. Flores. Reinberg, JBC 266, 9304. 1991.

- 118.Chen, Chin, Ueda, Clark, Pastan, Gottesman, Roninson, Cell 47, 381, 1988.
- 119.Ranish, Hahn, JBC 266, 19320.1991.
- 120.Sumimoto, Okhuma, Yamamoto, Horikoshi, Roeder, PNAS 87,9158.1990.
- 121.Lindquist,S. y Craig. 1988. Annu. Rev. Genet. 22,631-677.
- 122.Ellis y van der Vies S.M. 1991 Annu. Rev. Biochem. 60, 321-347.
- 123.Gething y Sambrook. 1992.Nature 355,33-45.
- 124.Hemmingsen, Woolford, van der Vies, S.M, Tilly, Dennis, Georgopoulos, Hendrix y Ellis. 1988. Nature 333,330-334.
- 125.Goloubinoff, Christeller, Gatenby y Lorimer. 1989. Nature 342,884-889.
- 126.Laminet, Ziegelhoffer, Georgopoulos y Pluckthun. 1990, EMBO J. 9,2315-2319.
- 127.Viitanen, Lubben, Reed, Goloubinoff, O' Keefe, y Lorimer. 1990. Biochemistry 29.5665-5671.
- 128.Buchner, Schmidt,Fuchs,Jaenicke,Rudolph,Schmid y Klefhaber. 1991 Biochemistry 30,1586-1591.
- 129.Mendoza, Rogers,Lorimer y Horowitz. 1991.J.Biol.Chem. 266,13044-13049.
- 130.Badcoe,Smith,Wood,Halsall,Holbrook,Lund y Clarke.1991.Biochemistry 30,9195-99200.
- 131.Martin,Langer,Boteva,Schramel,Horwich y Hartl. 1991.Nature 352,36-42.
- 132.Taguchi,Konishi,Ishii y Yoshida.1991.J.Biol.Chem.266,22411-22418.
- 133.Langer,Lu,Echols,Flanagan,Hayer y Hartl. 1992. Nature 356,683-689.
- 134.Pelham.1986.Cell 46,959-961.
- 135.Holt-Neugebauer, Rudolph,Schmidt, y Buchner.1991. Biochemistry 30,11609-11614.
- 136.Trent, Nimmesgem, Wall, Hartl, Horwich.1991 Nature 354,490-493.
- 137.Ishii,Taguchi y Yoshida.1992. FEBS Lett.299,169-174.
- 138.Jakob,Gaestel,Engel, y Buchner.1993.The J.Biol.Chem. 1517-1519.

139. Matsui, Segall, Well y Roeder. 1980. *J. Biol. Chem.* 256 :11992-11996.
140. Samuels, Fire y Sharp. 1982. *J. Biol. Chem.* 257:14419-14427.
141. Dynan y Tjan. 1983a. *Cell.* 32:669-680.
142. Sawadogo y Sentenac. 1990. *Annu. Rev. Biochem.* 59, 711.
143. Saltzman y Weinmann. 1989. *The FASEB Journal.* 13: 1723-1733.
144. Dynan y Burgess. 1979. *Biochemistry* 18,4581.
145. Guarente. 1987. *Ann. Rev. Biochem.* 21:425-452.
146. Stein y Hausen. 1970a. *Eur. J. Biochem.* 14,270.
147. Bagshaw y Malt. 1971. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 42,1207.
148. Chambon. 1975. *Annu. Rev. Biochem.* 44,613-638.
149. Hodo y Blattl. 1977. *Biochemistry* 16,2334.
150. D'Alessio. Spindler. Paule. 1979. *J. B. C.* 254,4085.
151. Smith y Braun. 1978. *E. J. B.* 82,309.
152. Blair. 1977. *Can. J. Biochem.* 55,1117.
153. Jendrisak. 1978. No publicado.
154. Kedingler, Gissinger y Chambon. 1974. *EJB* 44,421.
155. Dezelee, Wyers, Sentenac y Fromageot. 1976. *EJB* 65,543.
156. Guilfoyle y Malcolm. 1980. *Develop. Biol.* 78,113.
157. Walsh, 1975. In proteases and biological control (E. Reich, Rifkin y Shaw, eds), pp. 1-11. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
158. Lehninger. *Bioquímica.* 1982.
159. Haschemeyer y Haschemeyer: *Proteins, A guide to study by physical and chemical methods*, Wiley, Nueva York. 1973.
160. Moore. Stein. 1973. *Science* 180:458-464.
161. Tandford. 1973. *The hydrophobic effect*, Wiley-Interscience, Nueva York.
162. Rangel. Fernandez-Tomas. Dahmus y Gariglio. 1987. *Journal of Virology.* 61:1002-1008.
163. Rangel, Fernandez-Tomas. Dahmus. Gariglio. 1988. *J. Biol. Chem.* 263.19267-19269.
164. Neidhart, VanBogelen, Vaughn. 1984. *Ann. Rev. Genet.* 18:295-329.
165. Craig. 1985. *CRC. Critical Reviews in biochemistry.* 3:239-280.
166. Domínguez Francisco. Tesis de licenciatura : Virus del Síndrome del ojo azul (SOA) ENEP Iztacala 1993.
167. Repasky y Gregorio. 1992. *The structure of biological Membranes.* Editor Yeagle.
168. Yu. Fischman y Steck. *J. Supramol. Struct.* 1973, 1: 233-248.
169. Sheetz y Sawyer. *J. Supramol. Struct.* 1978, 8:399-412.

170. Bennet. *Biochim. Biophys. Acta* .1989, 988:107-121.
171. Nutritional Requerlments of Cuktured Cells: Bapat, Evans, Ganli, Ham, Hyodo, Katsuta, Kimoto, McKeehan, Modak, Namba, Niwa, Parshad, Ranadive, Sandford, Takaoka, Waymouth, Yamada ,Yamamoto, Yamane y Yasumura. 1977. Editado por:Hajim Kalsuta.
172. Ceccarini y Eagle. *Nature New Biology*. 1971. 233: 271-273.
173. Ceccarini y Eagle. *Proc. US. Nat. Acad. Sci.* 68., 229. 1971.
173. Levina. Becker. Boone. Eagle. *Proc. US. Nat. Acad. Sci* . 1965. 53, 350.
174. Yeh y Fisher. *Cell. Biol.* 1969, 40, 382.
175. Abercromble y Heaysman. 1954, *Exp. Cell res.* 6, 293-306.

BIBLIOGRAFIA ADICIONAL SOBRE CHOQUE TERMICO.

TI: Targeted single-cell induction of gene products in *Caenorhabditis elegans*: a new tool for developmental studies.

AU: Stringham-EG; Candido-EP

AD: Department of Biochemistry, U.B.C., Vancouver, Canada.

SO: *J-Exp-Zool.* 1993 Jul 1; 266(3): 227-33

ISSN: 0022-104X

PY: 1993

LA: ENGLISH

CP: UNITED-STATES

AB: Heat shock promoters have been employed to achieve tightly regulated expression of transformed genes in a wide variety of model systems including tissue culture cells, bacteria, yeast, *Drosophila*, and more recently *Caenorhabditis elegans*. Here we investigate the feasibility of using a laser microbeam to induce a sub-lethal heat shock response in individual cells of *C. elegans*. We demonstrate that in transgenic strains carrying heat shock promoter-lacZ fusions, single cell expression of beta-galactosidase in a variety of cell types of endodermal, mesodermal, or ectodermal origin can be achieved after pulsing with a laser. A tissue-general, inducible promoter can therefore be converted into one of single cell specificity which can be induced rapidly at any point in development, offering unique opportunities to study cell-cell interactions in *C. elegans*. This technique defines a new approach to generate mosaic animals and may be adaptable to other organisms or tissues.

MESH: beta-Galactosidase-genetics; Animals,-Transgenic; *Caenorhabditis-elegans*; Heat-Shock-Proteins-genetics; Lac-Operon; Lasers-; Recombinant-Fusion-Proteins-biosynthesis;

TI: Dual control of heat shock response: involvement of a constitutive heat shock element-binding factor.

AU: Liu-RY; Kim-D; Yang-SH; Li-GC

AD: Department of Medical Physics, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY 10021.

SO: Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A. 1993 Apr 1; 90(7): 3078-82

ISSN: 0027-8424

PY: 1993

LA: ENGLISH

CP: UNITED-STATES

AB: Heat shock factor (HSF) has been implicated as the key regulatory protein in the heat shock response. Our studies on the response of rodent cells to heat shock or sodium arsenite indicate that a high level of HSF-DNA-binding activity, by itself, is not sufficient for the induction of hsp70 mRNA synthesis; furthermore, a high level of HSF binding is also not necessary for this induction. Analysis of the binding of protein factors to the heat shock element (HSE) in extracts of stressed rodent cells indicates that the regulation of heat shock response involves the heat-inducible HSF and a constitutive HSE-binding factor. Our results also suggest that overexpression of human hsp70 may decrease the level of heat-induced HSF-HSE-binding activity in rat cells.

MESH: Base-Sequence; Blotting,-Northern; Cell-Line; DNA-Binding-Proteins-metabolism; Fibroblasts-metabolism; Heat-Kinetics-; Molecular-Sequence-Data; Oligodeoxyribonucleotides-; Rats-; RNA,-Messenger-genetics; RNA,-Messenger-metabolism; Transcription,-Genetic

MESH: *Heat-Shock-Proteins-metabolism; *Promoter-Regions-Genetics

TG: Animal-; Human-; Support,-U.S.-Gov't,-P.H.S.

PT: JOURNAL-ARTICLE

CN: CA31397CNCI; CA56909CNCI

RN: 0; 0; 0; 0

NM: DNA-Binding-Proteins; Heat-Shock-Proteins; Oligodeoxyribonucleotides; RNA,-Messenger

AN: 93219428

UD: 9307

TI: Heat-shock gene expression and cell cycle changes during mammalian embryonic development.

AU: Walsh-D; Li-K; Wass-J; Dolnikov-A; Zeng-F; Zhe-L; Edwards-M

AD: Department of Veterinary Clinical Sciences, University of Sydney, New South Wales, Australia.

SO: Dev-Genet. 1993; 14(2): 127-36

ISSN: 0192-253X

PY: 1993

LA: ENGLISH

CP: UNITED-STATES

AB: Synchronized regulation of cell division during gastrulation is essential for the regional proliferation of cells and pattern formation of the early CNS. The neural plate and neuroectoderm cells are a rapidly dividing and differentiating population of cells with a unique and rapid heat-shock response. Heat shock and the heat-shock genes were studied during neural plate development in a whole rat embryo culture system at 9.5-11.5 days. A lethal shock can cause cell death and severe developmental defects to the forebrain and eye during organogenesis. Heat shock can also result in acquired thermotolerance whereby cell progression is delayed at the G1/S and S/G2 boundaries of the cell cycle. This delay in cell cycle progression caused an overall lengthening of the cell cycle time of at least 2 hr. The heat shock genes may therefore function as cell cycle regulators in neuroectoderm induction and differentiation. The kinetics and expression of the hsp genes were examined in neuroectodermal cells by flow cytometry and Northern analysis. The levels of hsp mRNA 27, 71, 73, and 88 were identified following exposure at 42 degrees C (nonlethal), 43 degrees C (lethal) and 42 degrees/43 degrees C (thermotolerant) heat shock. Examination of hsp gene expression in the neural plate showed tight regulation in the cell cycle phases. Hsp 88 expression was enhanced at G0 and hsp71 induction at G2 + M of the cell cycle. Cells exposed to a thermotolerant heat shock of 42 degrees C induced hsp71 mRNA expression in all phases of the cell cycle with the mRNA levels of hsp27, 73, and 88 increased but relatively constant. Following a lethal heat shock, dramatic changes in hsp expression were seen especially enhanced hsp71 induction in late S phase. The regulated expression of hsps during the cell cycle at various phases could play a unique and important role in the fate and recovery of neuroectoderm cells during early mammalian embryo development.

MESH: Cell-Death; Cell-Differentiation-genetics; Central-Nervous-System-chemistry; Ectoderm-chemistry; Fetal-Development-physiology; Flow-Cytometry; Gene-Expression; Heat-adverse-effects; Heat-Shock-Proteins-biosynthesis; Immunoblotting-; Rats-; Stress-; Time-Factors

MESH: *Cell-Cycle-genetics; *Central-Nervous-System-embryology; *Fetal-Development-genetics; *Gene-Expression-Regulation; *Heat-Shock-Proteins-genetics

TG: Animal-; Support,-Non-U.S.-Gov't

TI: Transcriptional regulation in Drosophila during heat shock: a nuclear run-on analysis.

AU: Vazquez-J; Pauli-D; Tissieres-A

AD: Departement de Biologie Moleculaire, Universite de Geneve, Switzerland.

SO: Chromosoma. 1993 Mar; 102(4): 233-48

ISSN: 0009-5915

PY: 1993

LA: ENGLISH

CP: GERMANY

AB: We used a nuclear run-on assay as a novel approach to study the changes in transcriptional activity that take place in Drosophila melanogaster during heat shock. In response to a rapid temperature upshift, total transcriptional activity in cultured KC161 cells decreased proportionally to the severity of the shock. After extended stress at 37 degrees C (15 min or more), transcription was severely reduced, and at 39 degrees C most transcription was instantaneously arrested. However, strikingly different responses were observed for individual genes. Transcription of histone H1 genes was severely inhibited even under mild heat shock conditions. Transcription of the actin 5C gene decreased progressively with increasing temperature, while transcription of the core histone genes or of the heat shock cognate genes was repressed only under severe heat shock conditions. Transcriptional activation of the D. melanogaster heat shock genes was also investigated. In unshocked cells, hsp84 was moderately transcribed, while transcriptional activity at the other protein-coding heat shock genes was undetectable (less than 0.2 polymerases per gene). Engaged but paused RNA polymerase molecules were found at the hsp70 and hsp26 genes, but not at the other heat shock genes. The rates of transcription increased with increasing temperature with a peak of expression at around 35 degrees C. At 37 degrees C, induction was less efficient, and no induction was achieved after a rapid shift to 39 degrees C. Increased transcription of the heat shock genes was observed within 1-2 min of heat shock, and maximal rates were reached within 2-5 min. Despite very similar profiles of response, different heat shock genes were transcribed at strikingly different rates, which varied over a 20-fold range. The noncoding heat shock locus 93D was transcribed at a very high rate under non-heat shock conditions, and showed a transcriptional response to elevated temperatures different from that of protein-coding heat shock genes. An estimation of the absolute rates of transcription at different temperatures was obtained.

MESH: Chromosome-Mapping; Drosophila-melanogaster-metabolism; Gene-Expression-Regulation; Genetic-Techniques; Heat-adverse-effects; Heat-Shock-Proteins-genetics; Histones-genetics; Kinetics-; Promoter-Regions-Genetics; RNA-Polymerase-I-metabolism; RNA-Polymerase-II-metabolism; Stress-genetics

MESH: *Drosophila-melanogaster-genetics; *Transcription,-Genetic

TG: Animal-; Support,-Non-U.S.-Gov't

GS: hsp; hsc4

PT: JOURNAL-ARTICLE

RN: EC 2.7.7.-; EC 2.7.7.-; 0; 0

NM: RNA-Polymerase-I; RNA-Polymerase-II; Heat-Shock-Proteins; Histones

AN: 93251920

TI: Enhanced thermotolerance and temperature-induced changes in protein composition in the hyperthermophilic archaeon ES4.

AU: Holden-JF; Baross-JA

AD: School of Oceanography, University of Washington, Seattle 98195.

SO: J-Bacteriol. 1993 May; 175(10): 2839-43

ISSN: 0021-9193

PY: 1993

LA: ENGLISH

CP: UNITED-STATES

AB: The hyperthermophilic archaeon ES4, a heterotrophic sulfur reducer isolated from a deep-sea hydrothermal vent, is capable of protecting itself from thermal stress at temperatures above its optimum for growth. The thermotolerance of ES4 was determined by exposing log-phase cells to various lethal high temperatures. When ES4 was shifted from 95 to 102 degrees C, it displayed recovery from an exponential rate of death, followed by transient thermotolerance. When ES4 was shifted directly from 95 to either 105 or 108 degrees C, only exponential death occurred. However, a shift from 95 to 105 degrees C with an intermediate incubation at 102 degrees C also gave ES4 transient thermotolerance to 105 degrees C. The protein composition of ES4 was examined at temperatures ranging from 75 to 102 degrees C by one-dimensional electrophoresis. Two proteins with molecular masses of approximately 90 and 150 kDa significantly decreased in abundance with increasing growth temperature, while a 98-kDa protein, present at very low levels at normal growth temperatures (76 to 99 degrees C), was more abundant at higher temperatures. The enhanced tolerance to hyperthermal conditions after a mild hyperthermal exposure and the increased abundance of the 98-kDa protein at above-optimal temperatures imply that ES4 is capable of a heat shock-like response previously unseen in hyperthermophilic archaea.

MESH: Archaeobacteria-chemistry; Bacterial-Proteins-analysis; Blotting,-Western; Electrophoresis,-Polyacrylamide-Gel; Heat-adverse-effects

MESH: *Archaeobacteria-physiology

PT: JOURNAL-ARTICLE

RN: 0

NM: Bacterial-Proteins

AN: 93259925

UD: 9308

TI: MAP kinase activation during heat shock in quiescent and exponentially growing mammalian cells.

JU: Dubois-MF; Bensaude-O

LD: Genetique Moleculaire, URA CNRS 1302, Paris, France.

JO: FEBS-Lett. 1993 Jun 14; 324(2): 191-5

JSSN: 0014-5793

JY: 1993

JA: ENGLISH

JP: NETHERLANDS

AB: In numerous cases of signal transduction, the mitogen-activated protein kinases (MAP kinases) or extracellular regulated kinases (ERKs) are found to be activated by phosphorylations which result in electrophoretic mobility changes. Activities of MAP kinases in cytosolic extracts can also be monitored by the capacity of such extracts to phosphorylate myelin basic protein. These two assays were used to demonstrate that MAP kinases were rapidly activated during heat shock of both quiescent and exponentially growing mammalian (hamster, rat, mouse and human) cells. Thus, the MAP kinase cascade is likely to also ensure heat-shock signal transduction and contribute to the regulation of the complex array of metabolic changes designated as the heat-shock response.

WESH: Cell-Division; Cell-Free-System; Cells,-Cultured; Cricetus-; Cytosol-enzymology; Enzyme-Activation; Hamsters-; Heat-; Protein-Serine-Threonine-Kinases; Rats-; Signal-Transduction

WESH: *Protein-Kinases-metabolism

FG: Animal-; Comparative-Study; Human-; Support,-Non-U.S.-Gov't

PT: JOURNAL-ARTICLE

RN: EC 2.7.1.-; EC 2.7.1.37; EC 2.7.10; EC 2.7.10.-

NM: glycogen-synthetase-kinase; Protein-Kinases;

Protein-Serine-Threonine-Kinases;
extracellular-signal-regulated-kinase-1

AN: 93285334

UD: 9309

TI: Expression of a phosphorylation-resistant eukaryotic initiation factor 2 alpha-subunit mitigates heat shock inhibition of protein synthesis.

AU: Murtha-Riel-P; Davies-MV; Scherer-BJ; Choi-SY; Hershey-JW; Kaufman-RJ

AD: Genetics Institute, Cambridge, Massachusetts 02140.

SO: J-Biol-Chem. 1993 Jun 15; 268(17): 12946-51

ISSN: 0021-9258

PY: 1993

LA: ENGLISH

CP: UNITED-STATES

AB: Protein synthesis is dramatically reduced upon exposure of cells to elevated temperature. Concordant with this inhibition, multiple phosphorylation and dephosphorylation reactions occur on specific eukaryotic initiation factors that are required for protein synthesis. Most notably, phosphorylation of the alpha-subunit of eukaryotic initiation factor-2 (eIF-2 alpha) on serine residue 51 occurs. To identify the importance of phosphorylation in control of protein synthesis, we have evaluated the effects of expression of a mutant eIF-2 alpha which is resistant to phosphorylation. Expression of a serine to alanine mutant at residue 51 of eIF-2 alpha partially protected cells from the inhibition of protein synthesis in response to heat treatment. The overexpressed serine to alanine 51 mutant subunit was incorporated into the eIF-2 heterotrimer and was resistant to phosphorylation. These results are consistent with the hypothesis that heat shock inhibition of translation is mediated in part through phosphorylation of eIF-2 alpha. Expression of the wild type or mutant eIF-2 alpha did not affect cell survival or induction of hsp70 mRNA upon heat shock, indicating that although eIF-2 alpha is a heat shock-induced protein, its increased synthesis during heat shock does not alter the heat-shock response.

MESH: eIF-2-genetics; eIF-2-isolation-and-purification; Alanine-; Amino-Acid-Sequence; Cloning,-Molecular; CHO-Cells; Gene-Expression; Hamsters-; Macromolecular-Systems; Mutagenesis,-Site-Directed; Phosphorylation-; P r o t e i n s - b i o s y n t h e s i s ; Recombinant-Proteins-isolation-and-purification; Recombinant-Proteins-metabolism; Serine-; Transfection-

MESH: *eIF-2-metabolism; *Heat-; *Translation,-Genetic

TG: Animal-; Support,-U.S.-Gov't,-P.H.S.

PT: JOURNAL-ARTICLE

CN: GM22135GMNIGMS; GM07577GMNIGMS

TI: Effect of stress on protein degradation: role of the ubiquitin system.

AU: Raboy-B; Sharon-G; Parag-HA; Shochat-Y; Kulka-RG

AD: Department of Biological Chemistry, Alexander Silberman Institute of Life Sciences, Hebrew University of Jerusalem, Israel.

SO: Acta-Biol-Hung. 1991; 42(1-3): 3-20

ISSN: 0236-5383

PY: 1991

LA: ENGLISH

CP: HUNGARY

AB: Many factors which induce the stress response (heat shock protein synthesis) in eukaryotes also cause the formation of aberrant proteins. Such aberrant proteins are usually rapidly and selectively degraded in cells. Temperature step-up accelerates the degradation of a subset of normally stable proteins. This effect is transient and is confined to a narrow range of heat shock temperatures above which proteolysis is inhibited. The time course and extent of proteolysis elicited by a mild heat shock is consistent with data on the thermal transitions of cellular proteins. Biochemical and genetic evidence strongly supports the view that the ubiquitin system is primarily responsible for heat- or stress-damaged protein degradation in eukaryotic cells. It still remains to be determined how stress-damaged proteins are recognized by the ubiquitin system and selected for degradation. Ubiquitin-protein ligases (E3's) which attach multi-ubiquitin chains to proteins are thought to be responsible for the selection of proteins for degradation. Several species of E3 have recently been characterized. However, none of the known E3's seems to fulfil the role of selecting aberrant proteins for breakdown. Heat shock proteins which are thought to repair unfolded or misfolded proteins probably have a complementary function to the ubiquitin system which destroys damage proteins. The relationship between the

ubiquitin system and the regulation of heat shock protein synthesis, which is still not understood, is discussed.

MESH: Protein-Denaturation; Stress-

MESH: *Heat-adverse-effects; *Heat-Shock-Proteins-metabolism; *Ubiquitin-physiology

TG: Animal-; Support, -Non-U.S.-Gov't; Support,-U.S.-Gov't,-Non-P.H.S.

PT: JOURNAL-ARTICLE; REVIEW; REVIEW,-TUTORIAL

RN: 0; 56574-49-3

NM: Heat-Shock-Proteins; Ubiquitin

AN: 93206574

UD: 9306

TI: Heat shock protein response¹ in phosphorus-deficient heat-stressed broiler chickens.

AU: Edens-FW; Hill-CH; Wang-S

AD: North Carolina State University, Department of Poultry Science, Raleigh 27695-7635.

SO: Comp-Biochem-Physiol-B. 1992 Dec; 103(4): 827-31

ISSN: 0305-0491

PY: 1992

LA: ENGLISH

CP: ENGLAND

AB: 1. During acute in vivo heat stress, a normal heat shock protein (HSP) response was not inducible in chickens deficient in inorganic phosphorus (P(i)-deficient). 2. Small quantities of HSP 70 and HSP 90 were induced, but little or no HSP 23 was induced in P(i)-deficient chickens compared to P(i)-adequate chickens. 3. Increased susceptibility of P(i)-deficient chickens to acute heat stress was attributed to their inability to produce an adequate HSP response.

MESH: Autoradiography-; Cell-Separation-; Electrophoresis,-Polyacrylamide-Gel; Leukocytes-; Sulfur-Radioisotopes-diagnostic-use

MESH: *Chickens-metabolism; *Heat-; *Heat-Shock-Proteins-biosynthesis; *Phosphorus-deficiency; *Stress-metabolism

TG: Animal-

PT: JOURNAL-ARTICLE

RN: 0; 0; 7723-14-0

NM: Heat-Shock-Proteins; Sulfur-Radioisotopes; Phosphorus

AN: 93121754

UD: 9304

TI: Heat shock response and thermal resistance in cultured human retinal pigment epithelium.

AU: Wakakura-M; Foulds-WS

AD: Tennent Institute of Ophthalmology, University of Glasgow, Western Infirmary, Scotland, U.K.

SO: Exp-Eye-Res. 1993 Jan; 56(1): 17-24

ISSN: 0014-4835

PY: 1993

LA: ENGLISH

CP: ENGLAND

AB: The heat shock response was examined in cultured human retinal pigment epithelium (RPE) using indirect immunofluorescence. Mild heat shock (39.5-40 degrees C for 1 hr) caused no changes in cell morphology and cells continued to produce the intermediate filament proteins, cytokeratin (keratin) and vimentin. In addition, cells subjected to mild heat shock demonstrated the presence of a heat shock protein (HSP-90). After severe heat shock (45.5-46 degrees C for 1 hr) most cells showed marked morphological changes and, in addition, HSP-90 and/or stress-induced 40 kDa protein production was significantly enhanced. The expression of vimentin was relatively well preserved whereas that of keratin was markedly reduced. When the more severe grade of heat shock was preceded by mild heat shock 20-24 hr earlier, the subsequent severe heat shock resulted in less marked morphological change than in cells not preconditioned and, in addition, the expression of both vimentin and keratin was relatively well preserved. Mildly heat shocked cells appeared to gain thermal resistance supporting the theory that the concomitant synthetic capacity for HSP and normal cellular proteins contributes to thermal resistance. In doubly heat shocked cells, however, HSP-90 expression was not enhanced. The discrepancy between the expression of HSP and thermal resistance is discussed.

MESH: Aged-; Cells,-Cultured; Keratin-biosynthesis; Middle-Age; Pigment-Epithelium-of-Eye-metabolism; Vimentin-biosynthesis

MESH: *Heat-; *Heat-Shock-Proteins-biosynthesis; *Pigment-Epithelium-of-Eye-pathology

TG: Human-; Support,-Non-U.S.-Gov't

PT: JOURNAL-ARTICLE

RN: 0; 0; 9008-18-8

NM: Heat-Shock-Proteins; Vimentin; Keratin

AN: 93162125

UD: 9305