



Universidad Nacional Autónoma de México

**Escuela Nacional de Estudios Profesionales
" IZTACALA "**

**CARACTERIZACION Y PURIFICACION PARCIAL DE LA RNA
POLIMERASA II SOLUBLE EN CELULAS EUCARIONTES.**

T E S I S

Que para optar el Título de:

B I O L O G O

presenta

FLORIBERTO MIGUEL CRUZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO.

1)	ABREVIATURAS.	
II)	RESUMEN.	
III)	INTRODUCCION.....	1
1)	Composición en Histonas.	1
2)	Proteínas No-histonicas.	2
3)	Estructura de la Cromatina Activa.	6
4)	RNA Polimerasas.	8
5)	Virus SV40.	15
IV)	OBJETIVO DEL TRABAJO.	22
V)	MATERIAL.	24
VI)	METODOS.	27
1)	Obtención del Virus SV40.	27
2)	Obtención del complejo transcripcional de SV40..	28
3)	Electroforé ^u sis de Proteínas en geles de acrilamida en gradiente.	30
4)	Tinción de Proteínas en geles de acrilamida con Nitrato de plata.	33
5)	Iodación y Recuperación de Proteínas.	34
6)	Digestión proteolítica y mapeo peptídico de las subunidades.	36
7)	Preparación de la Proteína A-125 _T	37
8)	Separación de la RNA polimerasa II libre de la asociada.	38
9)	Cromatografía en Sephadex G-200.	40
10)	Cromatografía en Heparina-Agarosa.	41
11)	Cuantificación de Proteína.	42
12)	Transferencia de Proteínas a filtros de Nitrocelulosa.	43
VII)	RESULTADOS.	45
1)	Caracterización de la RNA polimerasa II unida a Complejos de Transcripción Viral de SV40.	45

2)	Caracterización de la RNA polimerasa II libre y-unida, tanto en células CV-1 como en hepatocitos de rata	53
3)	Solubilización de la RNA polimerasa II asociada a la cromatina con el detergente sarkosyl.....	75
VIII)	DISCUSION.....	80
IX)	REFERENCIAS.....	84

ABREVIATURAS,

ADN	Acido desoxirribonucleico.
ARN	Acido ribonucleico.
A	Angstrom.
cpm	Cuentas por minuto.
CTV	Complejo de transcripción Viral.
DNasa	Desoxirribonucleasa.
DTT	Dithiothreitol.
EDTA	Acido etilendinitrilo tetraacetico.
^{125}I	Iodo 125.
KI	Ioduro de potasio.
mCi	Mill Curies.
NHCP	Proteínas Cromosomales No Histicas.
^{32}P	Fosforo 32.
PMSF	Fenil metilsulfonil fluoruro.
POPOP	P-bis 2 (5-Feniloxazolil) - benceno.
PPO	2, 5 - Difeniloxazol.
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio.
SV40	Simian Virus 40.
TCA	Acido Tricloroacético.
TEA	Trietanolamina.
TEMED	N, N, N'N' - Tetrametiletilendiamino.
Tripsina	L - I - Tosilamida - 2 - feniletil clorometil cetona.
μCi	Micro Curies.
μl	Microlitros.

Actualmente, se conocen 3 clases de RNA polimerasas en células eucariontes.

Estas clases enzimáticas difieren entre sí en sus requerimientos iónicos, localización y función transcripcional. La RNA polimerasa I se encuentra en el nucleolo, sintetiza los RNA ribosomales y es insensible a la ²-amanitina, la RNA polimerasa III, se encuentra en el nucleoplasma, sintetiza los tRNA y 5 S ribosomales y es sensible a altas dosis de ²-amanitina la RNA polimerasa II se localiza en el nucleoplasma, transcribe los hnRNA y es sensible a bajas dosis de ²-amanitina.

Se han reportado distintas especies enzimáticas dentro de cada clase y estas especies varían únicamente en el P.M. de la subunidad más grande. Con respecto a la RNA polimerasa II, se conoce la existencia de tres especies diferentes conocidas como II0, IIA y IIB, estas especies difieren únicamente en el P.M. de la subunidad mayor de cada especie conocidas como II0 (240 Kd), IIA (214 Kd) y IIB (180 Kd); se sabe que la especie II0 representa menos del 10% con respecto a las otras dos especies en las purificaciones convencionales de la enzima. El resto de las subunidades muestra el mismo patrón electroforético para las tres especies.

También se sabe de la existencia de dos estados funcionales de la enzima en la célula, estas dos poblaciones se conocen como "libre y asociada a la cromatina". Se sabe que la población libre es activa para templados exógenos mientras que la unida es dependiente del DNA celular.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la composición peptídica tanto de la enzima libre como la de la población asociada a la cromatina, después de separar estas dos poblaciones tanto en células CV-1 como en hepatocitos de rata. Se encontró que la población libre está compuesta principalmente por la especie IIB mientras que la población unida es rica en la especie IIO. Asimismo, se encontró que esta última especie es altamente resistente al tratamiento con sarkosyl, un detergente que desprende todas las proteínas asociadas al DNA pero respeta a la RNA polimerasa activa en transcripción. Estos resultados sugieren que la especie IIO está involucrada en los procesos de reconocimiento e iniciación específica de la transcripción, mientras que la especie IIB pudiera ser una forma degradada de la enzima después de la transcripción. Al mismo tiempo, estos resultados sugieren que, al menos en extractos nucleares crudos, la especie IIO es la forma predominante de la enzima y que ésta es fácil de degradarse cuando los núcleos son sometidos a sonicación; este último tratamiento es un método de rutina para solubilizar la enzima durante su purificación.

INTRODUCCION.

Una de las mayores dificultades que se presentan al abordar el estudio del genoma en organismos eucariontes, es su elevado nivel de complejidad.

En dichos organismos, el material genético esta formando complejos con protefínas; el DNA de células eucariontes se encuentra asociado a una compleja estructura nucleoproteica formando la cromatina celular (1).

Las protefínas asociadas con el DNA en la cromatina se dividen principalmente en dos grupos: Histonas y protefínas no-histónicas.

COMPOSICION EN HISTONAS.

Las histonas son un grupo de protefínas de bajo peso molecular y altamente básicas, se conocen principalmente cinco clases de ellas (2), de las cuales, cuatro (H2a, H2b, H3 y H4) forman un octámero con dos moléculas de cada una de ellas. Este octámero compacta secciones de aproximadamente 200 pares de bases de DNA helicoidal de doble cadena para formar masas esféricas diferenciadas de 100-125 A de diámetro (nucleosomas) (2,3). El análisis con nucleasa micrococcal revela que estas subunidades están formadas por una partícula central o "core" que contiene el octámero de histonas y una cantidad constante de DNA (140 pares de bases) y una fracción de DNA enlazante o "linker" que une a las partículas "core" entre sí; la longitud de éstos varía de 15 a 100 pares de bases aproximadamente, dependiendo del organismo y tejido en estudio (4). (fig.1a.).

Es posible que la quinta histona (H1), sea uno de los --

factores que controlen la expansión y contracción cromosómica - durante el ciclo mitótico, como también de la cromatina interfásica durante la diferenciación celular.

El primer nivel de organización de la cromatina es finalmente la cadena nucleosomal (una fibra de aproximadamente 100 - A de grosor) que compacta el DNA aproximadamente 6 veces. El segundo nivel de organización es una fibra de aproximadamente 250 A de diámetro, que es generado por el enrollamiento helicoidal de la cadena nucleosómica, con aproximadamente 6 nucleosomas -- por vuelta originando una estructura en forma de "solenoides" -- (5). Esta fibra compacta el DNA aproximadamente 40 veces y necesita la participación de la histona H1. Esta fibra de 250 A se enrolla a su vez formando los cromómeros y éstos al empacarse -- aun más, forman el cromosoma metafásico, el cual, tiene un grado de compactación de aproximadamente 7 000-10 000 veces (6) -- fig. 1b.

El arreglo básico de la cromatina persiste durante todo - el ciclo celular; la cromatina mitótica, altamente condensada, - tiene el mismo contenido en histonas que las fibras interfásicas, - siendo éstas mucho más extendidas. La condensación de los - cromosomas puede estar relacionada, sin embargo, con una modifi - cación cíclica de las histonas, las cuales pueden ser fosfori - ladas, acetiladas y metiladas (7,8).

PROTEINAS NO-HISTONICAS.

En la cromatina, además de las histonas se encuentran una gran cantidad de proteínas no histónicas.

FIGURA 1.- NIVELES DE ORGANIZACION DEL DNA EUCARIONTE.

- a) El DNA esta acomplejado con histonas adquiriendo una estructura característica en forma de "cuentas de collar". Esta estructura es característica en núcleos interfásicos y el DNA tiene un grado de compactación de 6 veces.
- b) Cromosoma metafásico con un grado de compactación de 7 - a 10 mil veces.



FIG. 1

Los estudios por electroforesis en geles bi-dimensionales han reportado aproximadamente 450 proteínas cromosomales-no-histónicas (NHCP) diferentes en células Hela (9).

Existen evidencias que indican que entre las proteínas-NHC se incluyen enzimas del metabolismo cromosomal, activadores específicos de la expresión génica y proteínas estructurales involucradas en la alteración u organización de la fibra DNA-histona.

Así, las proteínas no histónicas pueden ser necesarias para el empaquetamiento del DNA en las fibras de 250 A de diámetro y para mantener la estructura en los cromosomas metafásicos (6,9').

En la cromatina, además de las histonas y proteínas no-histónicas, se encuentran algunas enzimas de carácter ácido, como las DNA y RNA polimerasas.

La expresión de la información contenida en el cromosoma es probablemente regulada, al menos en parte, por cambios locales en la estructura del cromosoma. Estas alteraciones estructurales, pueden definir la naturaleza de aquellas secuencias que van a ser transcritas y modular sus niveles de transcripción (10).

Existen evidencias (11-12), que sugieren que un mecanismo muy importante de regulación de la expresión genética está a nivel de la transcripción (fig. 2). Durante la diferenciación celular, la transcripción podría estar controlada, en parte por el nivel de metilación del DNA, por la estructura de la cromatina, la cual puede ser estructuralmente diferente al de las regiones reprimidas (13,14,15,16) por presencia de no his-

tonas (17, 18), por la inducción de hormonas tales como las esteroides entre las que se incluyen los estrógenos, progesterona, aldosterona, etc., y finalmente por la activación de las RNA polimerasas (19, 20, 21). En un menor grado, la expresión genética está controlada a nivel de la traducción y del procesamiento post-traduccional de las proteínas; los primeros candidatos para el control post-transcripcional son las proteínas que interactúan con el RNA en el núcleo, formando partículas ribonucleoproteicas (RNP), dado que, el procesamiento del RNA, su transporte al citoplasma y unión a ribosomas se lleva a cabo con el RNA acomplejado con proteínas; el RNA (excepto para los tRNA) nunca se encuentra desnudo en la célula. Se cree que las mismas proteínas que forman las partículas ribonucleoproteicas están involucradas en los eventos de procesamiento y/o transporte, (22).

ESTRUCTURA DE LA CROMATINA ACTIVA.

El estudio de la estructura molecular de la cromatina activa ha sido abordado principalmente por métodos bioquímicos y de microscopía electrónica.

En los genes ribosomales activos de X. Laevis, R. pipiens y Drosophila, la cromatina parece haber perdido la apariencia de "cuentas de collar" (nucleosomas) y estar sin compactación alguna. También se ha encontrado que la cromatina activa es preferencialmente digerida por DNasa I. La Sensibilidad a la DNasa I es muy alta en genes que han sido o serán transcritos. Por otro lado, el DNA contenido en las partículas nucleoproteicas liberadas por digestión suave con nucleasa microsomal o DNasa II,

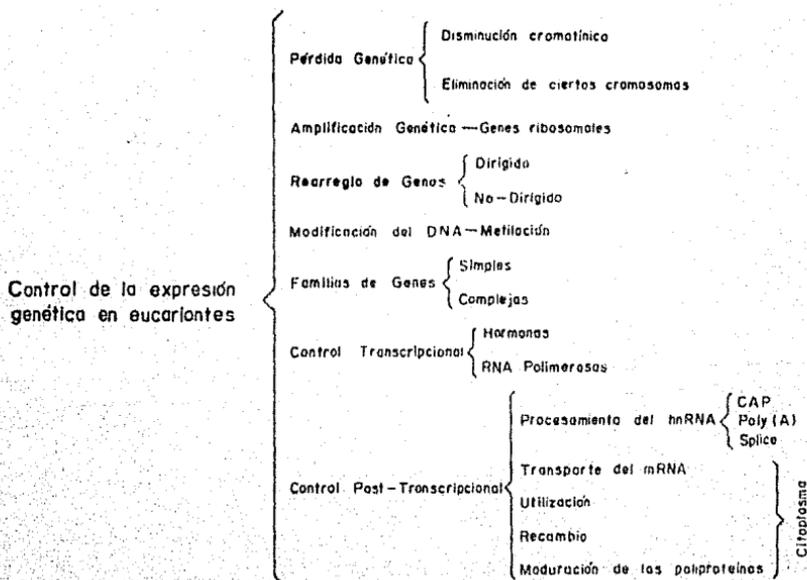


FIGURA 2.- CONTROL DE LA EXPRESION GENETICA EN EUCARIONTES.

Esquema en donde se muestran algunos niveles de regulación de la expresión genética en los sistemas eucariotes.

presenta secuencias de genes que están siendo expresados. Esto último sugiere que la cromatina activa exhibe una estructura -- repetitiva organizada, probablemente en nucleosomas. Además, se ha visto que ciertas regiones (el extremo 5' o región promotora) de varios genes activos son muy sensibles a las nucleasas como la DNasa I, II y a la nucleasa micrococcal. Mediante los estudios de digestión con nucleasa se ha determinado, indirectamente, que en la cromatina activa las histonas parecen estar presentes aunque irregularmente espaciadas (4 ó 5 por micrómetro, comparada con 28 cuentas por micrómetro en la cromatina inactiva). Esto concuerda con datos bioquímicos que sugerían ausencia de histonas en las regiones activas de la cromatina (23).

Sin embargo, el minicromosoma de SV40 activo en transcripción con una cadena naciente de RNA presenta una compactación similar a la cromatina viral inactiva (estructura nucleosómica), con aproximadamente 15 nucleosomas por micrómetro (24) fig.3.

RNA POLIMERASAS.

En los últimos años ha habido un gran avance al conocerse la existencia de varias formas de RNA polimerasa-DNA dependiente en células eucariontes, las cuales difieren en su estructura, localización y función (11).

Las primeras evidencias que sugerían fuertemente la existencia de varios tipos de actividad de RNA polimerasa en células eucariontes fueron aportados por Widnell y Tata., 1966 (25), estos autores reportaron que el tipo de RNA sintetizado en núcleos aislados a partir de hígado de ratón, es dramáticamente alterado por

FIGURA 3.- MINICROMOSOMA DE SV40 TRANSCRIPCIONALMENTE ACTIVO.

Microscopía electrónica del complejo transcripcional de SV40; el cual consiste de DNA asociado a histonas, RNA polimerasa II y la cadena naciente de mRNA.



FIG. 3 Minicromosoma
de SV40

el ion metálico divalente y la concentración de sal empleada. - A baja sal y en presencia de Mg^{2+} , se sintetiza un RNA rico en GC y como lo demuestra posteriormente Maul y Hamilton., 1967 -- (26), utilizando técnicas autorradiográficas, se encuentra principalmente en el nucleolo. Utilizando alta concentración de sal y Mn^{2+} , el RNA sintetizado es mas parecido en composición al -- DNA no ribosomal (Widnell y Tata, 1966) y se encuentra en el nucleoplasma, (Maul y Hamilton, 1967).

El hallazgo de Stirpe y Fiume., 1967 (27), que la ²-amanitina, inhibía específicamente la actividad de los núcleos de hígado de ratón en alta fuerza ionica, sugería nuevamente la existencia de distintos tipos de RNA polimerasa en los núcleos.

En 1969, Roeder y Rutter (28), lograron la purificación parcial y separación de tres tipos de RNA polimerasa en embriones de erizo de mar y de dos tipos en núcleos de hígado de rata. La separación de las enzimas se realizó por cromatografía en -- DEAE-sephadex. Estos autores denominaron a las distintas actividades como I, II y III dependiendo del orden de elución por un gradiente de concentración de sulfato de amonio en dicha columna.

Basados en su sensibilidad de las enzimas a la ²-amanitina, Kedinger, et.al., 1971 (29) clasificaron en A, B y C a las -- distintas actividades de acuerdo a su sensibilidad a esta droga. Las de tipo A, aquellas insensibles a la toxina, las de tipo B, muy sensibles a concentraciones bajisimas de la toxina----- (10^{-8} , 10^{-9} M) y las de tipo C, sensibles a concentraciones mas altas de ésta droga (10^{-4} , 10^{-5} M).

Actualmente se conocen tres tipos distintos de RNA polimerasa en organismos eucariontes que difieren en su estructura molecular y función transcripcional. La RNA polimerasa I se localiza en el nucleolo, sintetiza los RNA ribosomales, es estimulada por Mg^{2+} , exhibe una actividad óptima a baja concentración de sal y no es inhibida por α -amanitina. La RNA polimerasa III se localiza en el nucleoplasma, es responsable de la síntesis del RNA ribosomal 5S y RNAs de transferencia y es sensible a altas dosis de α -amanitina. La RNA polimerasa II localizada en el nucleoplasma transcribe los mensajeros y hnRNA, es estimulada por Mn^{2+} a alta fuerza iónica y es muy sensible a bajas concentraciones de α -amanitina.

Cada clase de enzima está compuesta de varias especies que probablemente difieren en una sola subunidad.

La estructura de la RNA polimerasa II es compleja. Se ha podido purificar a partir de distintos tejidos tanto en animales como en vegetales, encontrándose un alto grado de conservación evolutiva de la enzima. El patrón electroforético en gels de poliacrilamida-SDS revela entre 9 y 14 subunidades (Lewis y Burgess, 1982) (30), con un peso molecular alrededor de 600,000d.

Actualmente se conoce la existencia de tres especies de RNA polimerasa II conocidas como I10, I1A, y I1B (fig.4). Estas especies difieren solamente en la subunidad de mayor peso conocidas como I10, I1a y I1b con un peso molecular de 240 Kd, 214 Kd y 180 Kd, respectivamente. Actualmente se sabe que estas especies están relacionadas en su secuencia primaria y esto

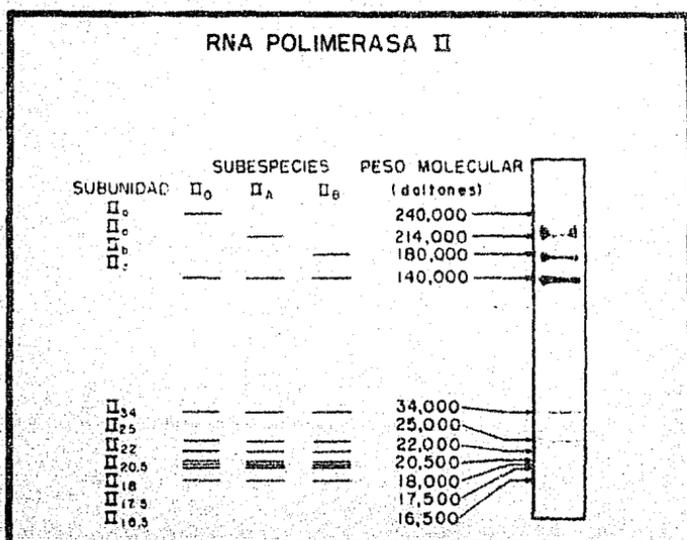


FIG. 4 Subespecies de la RNA Polimerasa II purificada de timo de ternera.

hace pensar que pudieran ser producto de un solo gen y que la heterogeneidad se deba ya sea al procesamiento diferencial del transcrito primario o al procesamiento del polipéptido I10.

También se sabe que la especie I10 representa un pequeño porcentaje (menor al 10%) del total de la enzima purificada. Las subunidades de menor peso, muestran el mismo patrón electroforético para las tres especies (31).

Christmann y Dahmus, 1981 (32), han reportado la producción de anticuerpos monoclonales específicos, contra la especie I1A de la RNA polimerasa II de timo de ternera. Estos anticuerpos reconocen a la subunidad mayor de la especie (I1A-214 Kd) y también reconocen al péptido I10 (240 Kd) de la especie I10.

Recientemente, Dahmus y Kedingler (33), han mostrado que los anticuerpos específicos contra las especies I10 y I1A, inhiben completamente la transcripción específica del promotor tardío de adenovirus-2 y de los promotores de ovoalbumina y conalbumina en sistemas *in vitro*; sin embargo, estos anticuerpos no inhiben la transcripción de DNA desnudo de timo de ternera, realizada por la especie I1B.

Asimismo, se ha reportado (34,35), el aislamiento de factores proteínicos que estimulan la actividad de la RNA polimerasa II en sistemas *in vitro* como los mencionados anteriormente. Dahmus, et. al., 1973 (36), ha descrito la existencia de varios factores proteínicos localizados en el núcleo que estimulan la actividad de la RNA polimerasa en células de tumor ascítico de Novikoff *in vitro*. Entre estos factores se encuentran dos proteínas cinasas (I y II), aisladas a partir de timo de terne-

ra y de células ascíticas de Novikoff, de las cuales, la cina-sa I, compuesta por un solo péptido de aproximadamente 37,000-de P.M., fosforila específicamente a la RNA polimerasa II in vitro, en presencia de $(8-32_P)ATP$. La autorradiografía del gel de poliacrilamida-SDS muestra fosforilación de los péptidos de 240 Kd, 214 y 20.5 Kd. Al parecer, la fosforilación ocurre en los residuos de fosfoserina y fosfotreonina de dichos péptidos (37). Esta fosforilación se acompaña de una estimulación en la actividad de la enzima (38). Sin embargo, aun no se ha establecido el papel fisiológico de la fosforilación de la enzima en su propiedad transcripcional.

A pesar de los notables avances en la comprensión de la RNA polimerasa solubilizada a partir de diversos tejidos, aún se desconoce el papel fisiológico de cada una de las especies reportadas así como el mecanismo de regulación que pudiera tener la actividad transcripcional de esta enzima en sistemas in vivo.

La gran complejidad del genoma eucariótico dificulta en gran parte el aislamiento y estudio de la cromatina transcripcionalmente activa en su estado nativo y de la RNA polimerasa asociada a dichos genes.

Para ello se ha recurrido a sistemas más simples que permitan el estudio de genes activos en transcripción y esta alternativa la presentan los virus.

VIRUS SV40.

El virus de simio 40 (SV40) ofrece un sistema modelo de--

estudio de genes eucariotes ya que es un virus relativamente simple y tiene que usar toda la maquinaria biosintética del hospedero. Tiene forma icosaédrica, esta formado por DNA y proteínas y puede inducir tumores en algunos animales, bajo ciertas condiciones. Estos virus pertenecen a la familia de los papovavirus (39).

DESCRIPCION GENERAL DEL VIRUS SV40.

Las partículas virales consisten únicamente de DNA y proteínas. El DNA es circular, de doble cadena y se encuentra en forma helicoidal. Cada virion contiene una molécula de DNA con un peso molecular aproximado de 3.6×10^6 daltones y 5243 pares de nucleótidos, que representan aproximadamente el 12% de la masa total del virion; está asociado con las histonas H3, H2a, H2b y H4 que toma del hospedero para formar la cromatina viral, dándole una estructura característica en forma de minicromosoma; una capsida icosaédrica consistiendo de 72 capsómeros envuelve la cromatina viral. Esta capsida está formada por las proteínas VP1 (45,000 d), VP2 (42,000 d) y VP3 (30,000 d), de las cuales, VP1 representa el 66% de la masa total del virion y constituye el 75% de las proteínas virales totales. VP2 y VP3 son componentes minoritarios de la capsida y junto con las cuatro histonas mencionadas anteriormente, forman el 25% restante de las proteínas virales. Los viriones tienen un diámetro aproximado de 45 nm y un coeficiente de sedimentación de 240 S, son muy resistentes al calor y son resistentes a solventes lipídicos, probablemente por la ausencia de lípidos en su estructura.

Los viriones infecciosos tienen una densidad aproximada de 1.34 g/ml en solución de cloruro de cesio, mientras que las capsides vacías tienen una densidad de 1.29 g/ml bajo las mismas condiciones.

El genoma de SV40 codifica para 5 proteínas solamente (fig.5), VP1, es codificado por el mRNA 16 S en la fase tardía de la infección y los mRNAs tempranos que codifican para dos proteínas: Los antígenos T "grande" (T) y t "pequeño" (t) con un peso molecular aproximado de 90,000 y 20,000 daltones respectivamente.

Los virus son propagados usualmente en cultivos primarios de células de riñón de mono. Cada célula infectada produce aproximadamente 10^5 partículas virales, lo que indica que 10^7 células infectadas en una caja P₁₀₀ producen aproximadamente 10^{12} partículas que contienen aproximadamente 5µg de DNA y 40 µg de proteínas. Como se mencionó anteriormente, SV40 es dependiente de la maquinaria celular para su replicación y síntesis de macromoléculas (40) y en infección lítica, la expresión de los genes virales ocurre en dos fases:

a) FASE TEMPRANA; 1) Adsorción del virus, penetración, transporte al núcleo, descapsidación; 2) Síntesis del mRNA temprano; 3) Acumulación del antígeno T intranuclear; 4) Incremento de la actividad de diferentes enzimas celulares; 5) Estimulación de la síntesis del DNA del hospedero.

b) FASE TARDIA; 6) Replicación del DNA viral; 7) Síntesis de los mRNA 16 S y 19 S tardíos; 8) Acumulación intranuclear de proteínas de la capsida; 9) Ensamble del virus; 10) Lisis celu

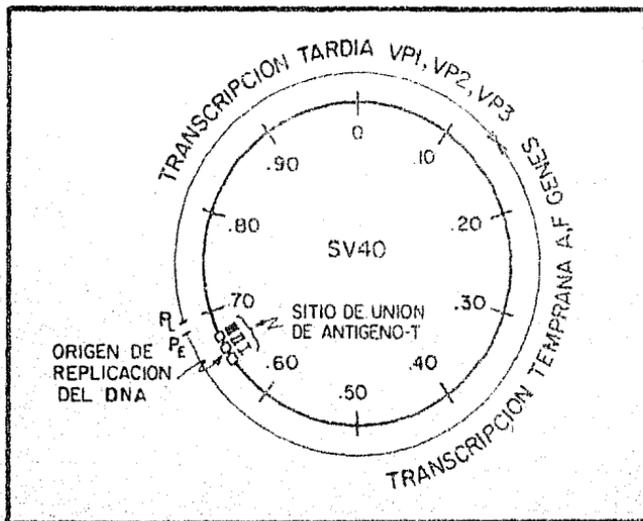


FIG. 5 Mapa Genético del virus SV40.

lar.

Durante la infección, el genoma de SV40 se encuentra en forma de cromatina circular y contiene aproximadamente 20 nucleosomas (formados a partir de las histonas celulares) que le dan un grado de compactación de 7 veces y una estructura característica en forma de minicromosoma (24); estas partículas pueden ser separadas del resto de la cromatina celular ya que no necesitan integrarse al genoma del hospedero para llevar a cabo los eventos de replicación y transcripción (43).

En la línea celular CV-1 de riñón de mono verde africano, SV40 causa infección lítica, produciendo aproximadamente 5×10^5 minicromosomas por célula, de los cuales, solo una pequeña fracción (0,5-1 %) se encuentra en forma de complejo transcripcional (42); este porcentaje representa de 2,000 a 5,000 genomas activos por célula, cifra que equivale a un número mucho mayor que el número de genes específicamente activos en células altamente especializadas. El DNA de estos complejos está compactado y presenta una estructura nucleosómica (24); estos complejos utilizan la RNA polimerasa II del hospedero para su transcripción (43).

Righthand y Bagshaw., 1974 (44), han reportado un incremento de la actividad de la RNA polimerasa II en cultivos de células CV-1 infectadas con SV40; este incremento ocurre al mismo tiempo que las síntesis del DNA viral; al parecer, el incremento en la actividad de la RNA polimerasa II no se debe a la presencia de más enzima en células infectadas, sino a la ca

pacidad de la enzima para alargar mas rapidamente las cadenas de RNA.

Por otra parte, se ha demostrado (45) que el detergente-anionico sarkosyl ($\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{CON}-(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{COONa}$) incrementa la actividad de la RNA polimerasa en células mitóticas de raton. El efecto estimulatorio ocurre sobre la RNA polimerasa - sensible a la 2 -amanitina que corresponde a la forma II o B. Este incremento se debe a por lo menos dos factores: un incremento en la actividad inicial de la RNA polimerasa II y una protonación de la reacción total de la enzima. Actualmente se sabe que el sarkosyl causa el desprendimiento de casi todas las proteínas asociadas al DNA celular pero no desprende a la RNA polimerasa que ya ha iniciado la transcripción (46).

Valiendose de éstas propiedades, Gariglio y Mousset., -- 1975 (43), aislaron el complejo transcripcional de SV40 en la fase tardía de la infección en células CV-1 de riñón de mono. Se encontró que al complejo DNA SV40-RNA polimerasa tiene una alta actividad transcripcional endógena que es altamente sensible a la 2 -amanitina, un inhibidor específico de la RNA polimerasa II.

Posteriormente, Gariglio, P. y Cols., 1979 (24), sedimentaron en gradientes de sacarosa, el complejo transcripcional de SV40 con un coeficiente de sedimentación de 55 S. Usando -- 0-(3H) metildimetil- 2 -amanitina, se observó que una población de RNA polimerasa II co-sedimenta con el complejo transcripcional. Al mismo tiempo se observó que existe una gran cantidad de la misma enzima que no esta asociada a complejos en trans--

cripción. A ésta población se le conoce como RNA polimerasa II libre y sedimenta en la región 10-16 S del gradiente mencionado anteriormente.

Así que, el sistema de SV40 ofrece la oportunidad de estudiar en forma directa algunos mecanismos involucrados en el proceso de regulación de la transcripción.

Al mismo tiempo, Yu, F.L., 1974 (47), reportó la presencia de dos estados funcionales de RNA polimerasa en fracciones nucleares y nucleolares de hígado de rata. Se encontró que la 2-amanitina inhibía fuertemente la actividad transcripcional en la fracción nucleoplasmica. Este autor denominó a los dos estados de la enzima como "unida y libre" respectivamente. La actividad de la enzima unida al templado endógeno es inhibida con actinomicina D, mientras que en el mismo ensayo se puede medir la actividad de la enzima libre usando un templado exógeno como poly (dC) o poly (dA-dT). Estos templados sintéticos son efectivos en dirigir la síntesis de RNA en presencia de actinomicina D.

En 1975, Yu, F.L. (48), reportó un método de separación directa de estas dos poblaciones de RNA polimerasa a partir de núcleos de hígado de rata. Se estimó que aproximadamente el 50% de la actividad total de la RNA polimerasa nuclear corresponde a la enzima libre (activa con templados exógenos); en base a ensayos de transcripción usando templados exógenos, se observó que esta actividad se pierde fácilmente cuando los núcleos aislados son sujetos a sonicación que se requiere para la solubilización de la RNA polimerasa unida a templados endógenos. Basándose en estas observaciones, este autor propuso un método en el que, los núcleos pueden ser aislados directamente en una solu-

ción de sacarosa hipertónica y posteriormente la enzima libre - puede ser extraída antes de que los núcleos sean sujetos a sonicación.

OBJETIVO DEL TRABAJO.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la estructura de la RNA polimerasa II eucariótica en genes activos (o potencialmente activos) y compararla con la estructura de la RNA polimerasa II "libre".

El tamaño, la gran complejidad de la cromatina, así como la transcripción selectiva de genes específicos y el rearrreglo de genes durante la diferenciación celular en eucariontes, hacen difícil la separación y el estudio de genes activos en transcripción en su estado nativo. Para simplificar el problema, nos hemos valido de sistemas mas simples que reúnen características similares a las de la cromatina eucariótica y éstas características las presentan los virus. En este trabajo, nos enfocamos principalmente a tratar de conocer la composición peptídica tanto de la RNA polimerasa II asociada a complejos activos en transcripción viral como la de la enzima libre en células CV-1. Al mismo tiempo, aprovechando la metodología descrita por Yu, F. (1975), caracterizamos la composición de la RNA polimerasa II libre y unida a la cromatina en núcleos de hígado de rata. En un intento por caracterizar a la enzima activa en transcripción en hígado de rata, utilizamos el detergente sarkosyl que se sabe desprende practicamente todas las proteínas del DNA pero respeta a la RNA polimerasa que está transcribiendo.

Para alcanzar estos objetivos, fue necesario cubrir algunos objetivos intermedios como son:

- 1) Sedimentación de los minicromosomas de SV40 en gradientes de sacarosa después de su extracción en etapas tardías de la infección.
- 2) Caracterizar electroforéticamente la composición peptídica de la RNA polimerasa II asociada a complejos activos en transcripción.
- 3) Mapeo tróptico de las subunidades asociadas al complejo de transcripción viral.
- 4) Separación y caracterización electroforética de la RNA polimerasa II libre de células CV-1.
- 5) Purificar parcialmente la enzima libre utilizando métodos cromatográficos de exclusión molecular y afinidad.
- 6) Separación y caracterización de la RNA polimerasa II libre y unidad de hígado de rata.
- 7) Purificación parcial de la RNA polimerasa II libre de hígado de rata como se describe en el punto 5.
- 8) Transferencia de los péptidos (previamente separados por electroforésis en geles de acrilamida-SDS) a filtros de nitrocelulosa y reacción con anticuerpos específicos contra la enzima purificada de timo de ternera producidos en conejos; dichos anticuerpos se usan como prueba directa para determinar la composición de la enzima en nuestros sistemas; para visualizar estos complejos proteína-Ab, se usó un segundo anticuerpo de chivo acoplado a peroxidasa y que esta dirigido contra IgG de conejo o bien, 125_i-proteína A que se une a la fracción Fc de los anticuerpos.

MATERIAL.MATERIAL RADIOACTIVO.

Orthophosphate ^{32}P (amersham International PLC)

^3H -Thymidina (Amersham international PLC. NEN)

^{125}I (NEN)

MATERIAL QUIMICO.

Triton X-100 (Sigma)

Nitrato de plata (Merck)

Sarkosyl NL-97 (CibaGeigy)

DTT (Calbiochem)

Acrilamida (BDH)

PMSF(Sigma)

Bis-acrilamida (BHD)

SDS (BDH)

TEMED (Bio-Rad)

Proteína A (Pharmacia Fine

Persulfato de amonio (Merck) Chemicals)

PPO (New England Nuclear)

HRP (Bio-Rad)

POPOP (Packard)

Sacarosa ultrapura (BRL)

MATERIAL BIOLÓGICO.

Ratas machos, raza Wistar

Linea celular CV-1 de riñón de mono verde africano.

Virus SV40 cepa 777.

RNA polimerasa II purificada de timo de ternera(donada generosamente por el Dr. M.E.Dahmus, Universidad de California, Davis).

Anticuerpos contra RNA polimerasa II de timo de ternera (donados por el Dr. M.E. Dahmus, Universidad de California, Davis).

Anticuerpos de chivo acoplado a peroxidasa dirigidos contra IgG

de conejo (Bio-Rad).

Tripsina

(L-Tosilamido-2-feniletíl-clorometil-cetona)--Worthington.

RESINAS.

Sephadex G-10 (Pharmacia fine chemicals)

Sephadex G-200 (Pharmacia fina chemicals)

Heparina-Agarosa (BRL)

COLORANTES.

Azul de Commasie (para preparar reactivo de Bradford)--Sigma.

Azul de bromofenol (Sigma)

Azul dextran (pharmacia Fine Chemicals).

MEDIOS CELULARES.

Medio Eagle modificado por Dulbecco- (GIBCO)

Suero fetal de ternera- (Bio-Cel).

OTROS.

Papel de nitrocelulosa-(Schleider & Shuel y Bio-Rad)

Albumina para estandarización de curvas de protefina-- (Sigma)

Albumina para bloqueo de los filtros de nitrocelulosa--(Sigma)

Placas autorradiográficas así como las soluciones de revelado y rollos para fotografía se obtuvieron de Kodak.

SOLVENTES .

Los solventes de grado analítico y reactivos se obtuvieron de Merck, Sigma, Packard y Baker.

MÉTODOS.

1) OBTENCIÓN DEL VIRUS SV40.

Se sembraron 50 cajas petri P₁₀₀ con 3×10^6 cel./caja 24 horas antes, se incubaron a 37°C en presencia de CO₂. Posteriormente se retiró el medio y se lavó con PBS. Se infectó con el virus a una M.O.I. de 0.01 PFU/cel en 0.5 ml de medio Dulbecco sin suero. Se permitió la adhesión del virus por 90 minutos a 37°C moviendo las cajas cada 20 minutos para uniformar la infección. Posteriormente se le añadió 10 ml/caja de medio Dulbecco conteniendo 2% de suero fetal de bovino y las cajas se incubaron a 37°C/CO₂ por aproximadamente 10 días (el efecto citopático se observa entre 7 y 10 días. A los 10 días post-infección se rasparon las células con un gendarme de hule, se pasaron a un tubo de centrifuga (frascos de 250 ml esteriles) y se centrifugaron a 8,000 rpm/30 min a 4°C en una centrifuga Sorvall-rotor SS34. En el sobrenadante esta la mayor parte del virus y el virus que queda en el paquete celular se resuspende en PBS- y se sonicó 3 veces por períodos de 5 segundos a 50 watts a -- 4°C. El sonicado se centrifugó a 8,000 rpm/30 min a 4°C y el sobrenadante se mezcló con el primero. El sobrenadante total se centrifugó en una centrifuga Beckman rotor SW28/37 ml tubo/ -- 25,000 rpm/5 horas a 4°C. El virus queda en el paquete y se resuspende en 1 ml/tubo de PBS o medio con 1% de suero fetal y se deja a 4°C mínimo 18 horas. Se mezcló un poco sin hacer espuma y se junto toda la suspensión de virus. Se centrifugó para separar agregados a 2,000 g/10 minutos a 4°C. En el sobre__

MÉTODOS.

1) OBTENCIÓN DEL VIRUS SV40.

Se sembraron 50 cajas petri P₁₀₀ con 3×10^6 cel./caja 24 horas antes, se incubaron a 37°C en presencia de CO₂. Posteriormente se retiró el medio y se lavó con PBS. Se infectó con el virus a una M.O.I. de 0.01 PFU/cel en 0.5 ml de medio Dulbecco sin suero. Se permitió la adhesión del virus por 90 minutos a 37°C moviendo las cajas cada 20 minutos para uniformar la infección. Posteriormente se le añadió 10 ml/caja de medio Dulbecco conteniendo 2% de suero fetal de bovino y las cajas se incubaron a 37°C/CO₂ por aproximadamente 10 días (el efecto citopático se observa entre 7 y 10 días. A los 10 días post-infección se rasparon las células con un gendarme de hule, se pasaron a un tubo de centrifuga (frascos de 250 ml esteriles) y se centrifugaron a 8,000 rpm/30 min a 4°C en una centrifuga Sorvall-rotor SS34. En el sobrenadante esta la mayor parte del virus y el virus que queda en el paquete celular se resuspende en PBS- y se sonicó 3 veces por períodos de 5 segundos a 50 watts a -- 4°C. El sonicado se centrifugó a 8,000 rpm/30 min a 4°C y el sobrenadante se mezcló con el primero. El sobrenadante total se centrifugó en una centrifuga Beckman rotor SW28/37 ml tubo/ -- 25,000 rpm/5 horas a 4°C. El virus queda en el paquete y se resuspende en 1 ml/tubo de PBS o medio con 1% de suero fetal y se deja a 4°C mínimo 18 horas. Se mezcló un poco sin hacer espuma y se junto toda la suspensión de virus. Se centrifugó para separar agregados a 2,000 g/10 minutos a 4°C. En el sobre__

nadante se obtiene todo el virus que se guarda en alícuotas de 1 ml a -20°C . Posteriormente se hace titulación por el método de PFU.

II) OBTENCION DEL COMPLEJO TRANSCRIPCIONAL DE SV40 POR EL METODO DE TRITON- NaCl .

Células CV-1 de riñón de mono verde africano (3×10^6 cel/placa, tres días antes de la infección) fueron crecidas en monocapa en cajas petri P₁₀₀ con medio Eagle modificado por Dulbecco y suplementado con 10% de suero fetal de ternera. Las placas (7×10^6 cel/caja) fueron infectadas con el virus SV40 a una multiplicidad de 10 P.F.U./cel en 0.5 ml de medio sin suero. Las células bajo infección fingida (células de referencia) fueron tratadas bajo las mismas condiciones excepto que no fueron infectadas y en su lugar se le agregó a cada caja, 0.5 ml de medio sin suero. El stock de virus SV40 (línea 777) fue purificado parcialmente según la metodología descrita anteriormente. Se permitió la adsorción del virus durante 90 minutos a 37°C moviendo cada 20 minutos las cajas para permitir una mejor adhesión del virus. Después de la infección, las células fueron incubadas con 10 ml del medio mencionado anteriormente suplementado con 2% de suero fetal de ternera. A las 20-22 horas post-infección, el DNA fue marcado con ^3H -Timidina (10-20 μCi /caja dependiendo del experimento). A las 40-42 horas post-infección, se retiró el medio por aspiración y se lavaron dos veces con Buffer A conteniendo: 25 mM Tris-HCl pH 7.9, 140 mM NaCl , 1 mM Na_2HPO_4 . Posteriormente se le agregó 1 ml de Buffer

A a cada caja y las células fueron raspadas con un gendarme de hule y juntadas en un tubo falcon (50 ml). Las siguientes operaciones fueron realizadas a 4°C. Las células fueron empastilladas 5 minutos a 1,500xg en una centrífuga clinica y resuspendidas por pipeteo suave en 0.25 ml/caja de Buffer hipotónico B conteniendo: 25 mM Tris-HCl pH 7.9, 2 mM EDTA 1 mM DTT, 0.2 mM PMSF y la suspensión fue llevada a un tubo corex de 15 ml conteniendo del fondo al tope: 4 ml de sacarosa 0.8 M en buffer C (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 0.2 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.2 mM PMSF), 2 ml de sacarosa 0.5 M en buffer C conteniendo 0.25 % triton X-100 y 2 ml de sacarosa 0.3 M en buffer C. Se puso cuidadosamente el equivalente a 5-6 cajas -- (1.5 ml). Los núcleos se purificaron por centrifugación a -- 8,500 rpm por 45 minutos en una centrífuga Sorvall rotor 9934, los núcleos fueron resuspendidos en 0.25 ml/caja de buffer D conteniendo 0.25% triton X-100, 10 mM Tris-HCl pH 7.9, 1 mM DTT, 0.2 mM PMSF. Se ajustó a una concentración final de 0.4 M de NaCl y la solución se incubó por 30 minutos a 4°C y centrifugado a 12,000 rpm por 10 minutos a 4°C en una centrifuga Sorvall rotor SS34. El sobrenadante, conteniendo la cromatina viral (10-20 µg DNA SV40/placa) fué separado cuidadosamente de la pastilla de cromatina celular y la muestra de cromatina viral (1.25 ml), fué llevado sobre un gradiente lineal de sacarosa del 10-40% en 10 mM Tris pH 7.9, 0.2 mM EDTA, 0.4 M NaCl, 1 mM DTT y 0.25 mM PMSF y centrifugado por 4 horas a -- 36,000 rpm en una ultracentrifuga Beckman rotor SW40 a 4°C. Se colectaron fracciones de aproximadamente 600 µl y se toma-

ron alícuotas de 20 µl de cada fracción para determinar la actividad específica del complejo marcado con ^3H -Timidina. Las alícuotas se pusieron en filtros Whatman 3 MM y se lavaron 5 veces en TCA al 5% y 2 veces con etanol comercial por períodos de 5 minutos a 4°C. Los filtros se secaron y se contaron durante 1 minuto en 5 ml de la mezcla de líquido de centelleo (PPO - 1.25% POPOP 0.04% disuelto en tolueno) en un espectrofotómetro de centelleo Packard modelo C2425 para tritio-carbono, bajo condiciones automáticas.

III) ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN GELES DE ACRILAMIDA-SDS EN GRADIENTE (5-17.5%).

Para la preparación de los geles, se siguió la metodología descrita por Laemmli, U., 1970 (49).

Los geles se prepararon mediante un gradiente continuo en el rango del 5 al 17.5% de acrilamida con el propósito de obtener una mayor resolución, tanto de las proteínas de alto P.M. como las de bajo P.M.

Preparación de las soluciones stock (acrilamida 30% --Bis--acrilamida 0.8%).

Para un volumen final de 500 ml se usaron: 150 g de acrilamida, 4 g de NNN'-Bis-Metilen-acrilamida, 150 ml de glicerol al 87%, la solución anterior se afora a un volumen final de 500 ml con agua bidestilada. La solución se filtra en un Buchner usando una capa de papel Whatman 3 MM.

Buffer del gel concentrador.- 100 ml de una solución 8x se

prepararon de la siguiente manera: 187.5 ml de Tris-HCl 2 M pH-6.8, 3.2 ml de SDS al 25% y 40.8 ml de agua bidestilada.

-Buffer del gel separador.-200 ml de una solución 5x se prepararon de la siguiente manera: 187.5 ml de Tris 2 M pH 8.8, 4 ml de SDS al 25% y 8.5 ml de agua bidestilada.

-La solución de persulfato de amonio al 10% (P/V) se prepara al momento.

-Buffer de muestra 6x.- El buffer de muestra se prepara momentos antes de ser utilizado y contiene lo siguiente: 215 μ l de Tris 2 M pH 6.8, 500 μ l de SDS al 25%, 310 μ l de B-mercaptoetanol y 100 μ l de azul de bromofenol al 0.2%.

-Buffer de corrida.- 1 L de una solución 10x se prepara de la siguiente manera: 30.28 g de Tris (base), 144.1 g de glicina, 40 ml de SDS al 25%, agua bidestilada hasta un litro.

PREPARACION DE GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS EN PLACA.

Las soluciones de trabajo (5 y 17.5% de acrilamida) se preparan separadamente agregando una concentración final del buffer separador de 0.375 M Tris pH 8.8, 0.1% SDS, 5% glicerol; se agitan suavemente y posteriormente se le agrega TEMED a una concentración final de 0.04% y persulfato de amonio a una concentración final de 0.02% para acelerar la polimerización del gel.

El gel se hace utilizando un formador de gradiente. Para obtener la superficie del gel bien horizontal, se coloca inmediatamente sobre el gel una solución de SDS al 0.1%. Después de polimerizado el gel; se retira la solución y se lava con agua.

bidestilada, el residuo de agua se seca con papel Whattman 3 MM. la polimerización del gel se logra después de 30 minutos.

El gel concentrador (10 ml) se prepara a una concentración final de acrilamida al 5%--Bis acrilamida 0.13%, 0.125 M Tris pH 6.8, 0.1% SDS (presente en el buffer concentrador), TEMED a una concentración final de 0.04% y persulfato de amonio a una concentración final de 0.5%, la polimerización del gel se alcanza en 20 minutos.

Para formar los carriles, se coloca en el gel concentrador un formador de carriles (peine) del tamaño deseable, después de haberse formado los pozos para las muestras, se quita el peine y los pozos se lavan con agua bidestilada.

Las muestras se ajustan a un mismo volúmen (no excediendo de un volúmen final de 100 μ l) con Buffer A₂₅ que contiene 0.05-M Tris-HCl pH 7.9, 0.1 mM EDTA, 0.2 mM DTT, 25% glicerol y se tratan con el buffer de muestra a una concentración final de 0.0625 M Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol, 5% B-mercaptoetanol y 0.001% de azul del bromofenol, posteriormente las muestras se llevan a 85°C en baño maría por 5 minutos.

El buffer de corrida se usa a una concentración final de 0.025 M de Tris pH 8.3, 0.192 M glicina, 0.1% SDS. la electroforesis se realizó a 60 volts por el tiempo necesario hasta que el colorante (azul de bromofenol) haya llegado al otro extremo del gel.

Posteriormente el gel fué llevado en metanol al 50% para fijar las proteínas y posteriormente se tiñeron con nitrato de plata o bien se lavaron durante 30 minutos en buffer de transferen-

cia (ver mas adelante) para la transferencia de las protefnas a filtros de nitrocelulosa cuando fué necesario.

IV) TINCION DE PROTEINAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA CON NITRATO DE PLATA SIGUIENDO LA METODOLOGIA DESCRITA POR WRAY, Y COLS., 1981- (50).

Debido a que la cantidad de protefna que se usaba en los ensayos de electroforésis era muy limitado, la visualización de los péptidos usando el método convencional de tinción con azul de Coomassie resultaba muy difícil. Para resolver este problema, desarrollamos la tinción con nitrato de plata que es un método mucho mas sensible que el de azul de Coomassie y que es capaz de detectar nanogramos de proteínas.

PROCEDIMIENTO BASICO PARA LA TINCION.

- 1) Disolver 0.8 g de nitrato de plata en 4 ml de agua bidestilada
- 2) Mezclar 21 ml de hidroxido de sodio al 0.36% y 1.2 ml de hidroxido de amonio concentrado.
- 3) Agregar la solución 1 a gotas a la solución 2 con agitación vigorosa y posteriormente aforar a 100 ml con agua bidestilada. La solución resultante debe ser usada en un período no mayor de 5 minutos. La tinción de los geles se realiza por un período de 20 minutos con agitación constante en un agitador giratorio. Posteriormente se retira la solución de tinción y los geles se lavan con agua bidestilada por un período de 5 minutos con agitación suave. Al mismo tiempo se prepara la solución reveladora, la cual consiste de: 2.5 ml de ácido cítrico al 1% y 0.25 ml de formalde-

hido al 38% la mezcla se afora a un volumen final de 500 ml con agua bidestilada. Para desarrollar la tinción, se retira el agua del gel y se le agrega la solución de revelado. La aparición de las bandas ocurre generalmente antes de los 10 minutos aunque -- pueden ser más. Para detener la reacción, se retira la solución-reveladora y el gel se lleva a una solución de ácido acético al 1%.

V) IODACION DE LAS PROTEINAS.

Las proteínas asociadas al complejo de transcripción viral así como las subunidades de la RNA polimerasa II de timo de ternera fueron separadas por electroforesis en un gradiente lineal del 5 al 17.5% de acrilamida-SDS siguiendo el procedimiento de Laemmli (1970). Después de teñir el gel con nitrato de plata, se cortaron los peptidos de interes (180 kd de timo de ternera y los peptidos con un P.M. de 240 y 214 kd) asociados al complejo de transcripción viral (CTV) y que creemos corresponden a los -- peptidos IIO y IIA de la enzima. Para la extracción de la protefina del gel y su iodación, se siguió el método descrito por Tolan y Cols. (1980) y Dahmus (1983) (51-52).

- a) Las bandas se lavaron dos veces con agua bidestilada por períodos de 10 minutos y posteriormente se maceraron por separado en tubos cónicos.
- b) El macerado se dejó secar por 1 hora sobre hidroxido de sodio en un desecador al vacio. Posteriormente el macerado se resuspendió en 0.4 ml de buffer de extracción conteniendo: 50 mM - trietanolamina-HCl pH 8, 1% (P/V) SDS purgado con N₂ y posterior

mente se le añade DTT a una concentración final de 5 mM. La suspensión se lleva por 15 minutos a 65°C y posteriormente se deja a temperatura ambiente toda la noche.

c) La suspensión se filtra a través de fibra de vidrio con el propósito de eliminar la acrilamida y a la solución conteniendo la proteína se le agregaron 0.2 ml mas de buffer de extracción. Posteriormente se le agregó 10 µl de iodoacetamida 100 mM y se dejó a temperatura ambiente por 30 minutos.

d) Se añadieron 5 µl de KI 5 mM y 50 µCi de ¹²⁵I por banda.

e) La reacción de iodación se inició transfiriendo la mezcla de proteína/iodo a un tubo de vidrio "Soda-Lime" cubierto con 20 µl de iodogen a una concentración de 1.8 mg/ml en cloroformo y secado con nitrógeno gaseoso.

f) Después de 15 minutos a 0°C, la reacción fue detenida transfiriendo la mezcla de proteína al tubo original donde se había añadido previamente 10 µl de B-mercaptoetanol.

RECUPERACION DE LA PROTEINA MARCADA.

(Todos los pasos se realizaron a 0°C).

a) Se añadió 1/10 del volumen de muestra de acetato de potasio y se dejó precipitar por 30 minutos. Posteriormente se centrifugó por 15 minutos en una centrifuga clinica.

b) La pastilla se resuspendió en 2 ml de acetona conteniendo 0.1 M de HCl. En este paso, también se le agregó 100mg de BSA como acarreador. Se centrifugó como en el paso anterior. Se lavó nuevamente con la mezcla de acetona-HCl y se centrifugó nuevamente para empastillar la proteína.

c) La pastilla se resuspendió en 1 ml de TCA al 10% (P/V) y dejado a 0°C por 30 minutos. Posteriormente se centrifugó como en el primer paso. La pastilla se resuspendió nuevamente con 1 ml de acetona y centrifugado nuevamente.

d) La pastilla se dejó secar por 1 hora sobre NaOH en un desecador al vacío. Posteriormente, la proteína se guardó a 4°C.

VI) DIGESTION PROTEOLITICA Y MAPEO PEPTIDICO DE LAS SUBUNIDADES.

a) Cada subunidad se disolvió en 200 µl de bicarbonato de amonio 0.05 M pH 8.0 y se le añadió 1 µl de tripsina (0.5 mg/ml bicarbonato de amonio).

b) La muestra se incubó a 37°C por 3 horas y después se le agregó nuevamente 1 µl de tripsina y la incubación se dejó por 3 horas más.

c) Al final de la digestión, la muestra se congela y se lleva a liofilizar. El liofilizado se disolvió en 25 µl de agua, se centrifugó suavemente con el propósito de que todo el líquido quede en el fondo del tubo y se volvió a liofilizar. El liofilizado se disolvió en 5 µl de una mezcla de 1-Butanol/ácido acético/agua/piridina en una relación 15:3:12:10.

d) Se tomaron alícuotas de 0.2-0.5 µl conteniendo $1-2 \times 10^4$ cpm y se colocaron en placas de TLC-celulosa (10x10 cm) para realizar una electroforésis en capa fina a un pH 4.4 en una mezcla de ácido acético/piridina/agua/acetona (4:2:79:15) por 2 horas a 200 V a 4°C. Después de la electroforésis, las placas fueron secadas y sometidas a una cromatografía en segunda dimensión en 1-Butanol/ácido acético/agua/piridina (15:3:12:10). Las placas se se

caron y fueron expuestos sobre un film para rayos-X Kodak-X-Omat AR con una pantalla intensificadora a -80°C por 24 horas.

VII) PREPARACION DE LA PROTEINA A-125- I .

(Para la preparaci3n de la prote3na A-125I se sigui3 la metodol3g3a proporcionada por el Dr. M.E.Dahmus, Universidad de California, Davis, comunicaci3n personal).

Se prepar3 un tubo "Soda-Lime" 13x100 mm (Beckton & Dickin-son) con iodogen (Pierce), 1-2 mg disuelto en cloroformo (1.8 mg/ml). De la soluci3n anterior se tomaron 20 μl y se pusieron en el tubo (Soda-Lime) secandolo inmediatamente con nitr3geno gaseo so tratando de distribuir uniformemente el iodogen en el fondo del tubo. Por otro lado, en un tubo de vidrio se mezclaron (a 4°C) en el siguiente orden: Buffer TEA, 1 mCi 125 I , 5 μl de prote3na A (5 mg/ml). El vol3men final es de 300 μl , el vol3men de buffer TEA depende del vol3men de 125 I equivalente a 1 mCi. La mezcla anterior se transfiri3 al tubo soda-lime y se incub3 durante 15 minutos a 4°C agitando suavemente la mezcla 2 6 3 veces. Posteriormente, la mezcla se regres3 al tubo original conteniendo 5 μl de B-mercaptoetanol para detener la reacci3n, se mezcl3 suavemente y se llev3 a una col3mna de sephadex G-10 (10 ml de vol3men de lecho) equilibrado con buffer TEA. La mezcla se dej3 pasar por gravedad y se colectaron 10 fracciones de 20 gotas; esto se hizo con el fin de separar la prote3na A-iodada del 125 I libre. Se tomaron 2 μl de cada fracci3n y se llevaron a contar en un contador gama bajo condiciones autom3ticas. La prote3na A -

iodada eluyo generalmente en la fracción 5 y fué la que se usó para los ensayos de inmunotransferencia.

VIII) SEPARACION DE LA RNA POLIMERASA LIBRE DE LA ASOCIADA.

Para la obtención de la RNA polimerasa II libre de células CV-1. Las células fueron crecidas en monocapa en cajas P₁₀₀ a una densidad aproximada de 6×10^6 células/placa en 10 ml de medio Eagle modificado por Dulbecco suplementado con 10% de suero fetal de ternera. Posteriormente se les retiró el medio y la monocapa se lavó 2 veces con 2 ml de buffer A conteniendo: 25 mM Tris-HCl pH 7.9, 140 mM NaCl, 5 mM KCl y 1 mM Na₂HPO₄, enseguida se le agregó 1 ml de buffer A a cada caja y las células fueron raspadas con un gendarme y colectadas en un tubo falcon de 50 ml. Las células se empastillaron por centrifugación a 1,500xg en una centrífuga clinica y resuspendidas en buffer B (0.25 ml/caja) -- conteniendo: 25 mM Tris-HCl pH 7.9, 2 mM EDTA, 1 mM DTT y 0.2 mM PMSF y la suspensión celular fué llevado a un tubo corex de 15 ml conteniendo del fondo al tope: 4 ml de sacarosa 0.8 M en buffer C (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.2 mM PMSF), 2 ml de sacarosa 0.5 M en buffer C conteniendo 0.25% triton X-100 y 2 ml de sacarosa 0.3 M en buffer C y la cantidad de células equivalentes a 10 cajas fue centrifugado a 8,500 rpm en una centrífuga Sorvall rotor SS34 durante 45 minutos a 4°C para empastillar los núcleos. Posteriormente, los núcleos fueron resuspendidos en sacarosa 0.34 M (0.25 ml/caja) e incubados durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente, la suspensión fué centrifugada a 3,000 rpm durante 10 minutos en una cen-

trífuga Sorvall rotor SS34 a 4°C. El sobrenadante, conteniendo la RNA polimerasa II libre fue separado cuidadosamente de la pastilla y guardado a -20°C para los experimentos posteriores o bien, se pasó inmediatamente por una cromatografía en sephadex G-200.

Cuando la separación de las dos poblaciones enzimáticas se realizó a partir de hígado de rata, se siguió la metodología descrita por Yu, F. (1975). Se utilizaron ratas macho, raza Wistar de aproximadamente 250-300 g de peso y los núcleos fueron obtenidos por homogenización del hígado en 2 volúmenes de sacarosa 2.3 M/3.3 mM CaCl₂, el homogenizado fue filtrado a través de 4 capas de gasa estéril y la suspensión fue ajustada con 8 volúmenes más de sacarosa 2.3 M/3.3 mM CaCl₂. El homogenizado fue centrifugado a 25,000 rpm durante 45 minutos en una ultracentrífuga Beckman rotor SW28 a 4°C, con el fin de empastillar los núcleos. Posteriormente, los núcleos purificados fueron resuspendidos cuidadosamente en sacarosa 0.34 M (0.5 ml/g original de tejido) e incubados por 15 minutos a 4°C. El homogenizado fue centrifugado por 10 minutos a 3,000 rpm en una centrífuga Sorvall rotor SS34 a 4°C; el sobrenadante, conteniendo la enzima libre fue separado cuidadosamente de la pastilla y la pastilla resultante en este paso, tanto de células CV-1 como de hígado de rata conteniendo la enzima unida fue resuspendida en 10 mM Tris-HCl pH 7.9, 1 M sacarosa, 5 mM MgCl₂, 20 mM B-mercaptoetanol (0.5 ml/g original de tejido). Ambas poblaciones fueron analizadas por electroforesis en geles de acrilamida-SDS teñidos con nitrato de plata o bien, inmunotransferencia en filtros de nitrocelulosa e incuba-

dos con anticuerpos contra la enzima.

Cuando tratamos de caracterizar a la enzima activa en transcripción en la cromatina de hígado de rata, utilizamos el detergente sarkosyl aprovechando sus características mencionadas anteriormente. Luego de separar la RNA polimerasa II libre como se describe anteriormente, la pastilla nuclear conteniendo la enzima unida únicamente, se resuspendió en buffer conteniendo 10 mM Tris-HCl pH 7.9, 1 M sacarosa, 5 mM $MgCl_2$, 20 mM B-mercaptoetanol (0.5 ml/g original de tejido) y se tomaron 2 alícuotas de 1.5 ml cada una para realizar el experimento a 4 y 30°C respectivamente con el fin de observar si existía alguna diferencia bajo estas dos temperaturas. A cada alícuota se le agregó sarkosyl a una concentración final de 1% y se dejó incubando por 10 minutos a las temperaturas mencionadas. Posteriormente, las alícuotas se llevaron a centrifugar a 20,000 rpm por 20 minutos a 4°C en una ultracentrífuga Beckman rotor SW50.1 con el propósito de empastillar el DNA con la enzima unida y separarla de la enzima que se haya desprendido con el sarkosyl. Los sobrenadantes (aproximadamente 1.3 ml) de 4 y 30°C fueron separados de la pastilla y ésta se resuspendió en 500 μ l del Buffer mencionado anteriormente. Alícuotas de 100 μ l del sobrenadante conteniendo 1% sarkosyl y de la pastilla de DNA conteniendo la enzima unida, fueron sometidas a electroforésis en geles de acrilamida-SDS y teñidas con nitrato de plata, o bien, transferidas a filtros de nitrocelulosa para su detección, usando anticuerpos dirigidos contra la enzima.

IX) CROMATOGRAFIA EN SEPHADEX G-200.

Las columnas, con capacidad para 20 ml de volúmen de lecho, fueron lavadas con NaOH 1 M y neutralizadas con agua bidesti-

lada esteril. La resina (Sephadex G-200) se hidrato con un exceso de buffer de equilibrio conteniendo: 10 mM Tris-HCl pH 7.9, 0.2 mM EDTA, 0.2 M NaCl, 0.2 mM PMSF, 10% (P/V) glicerol y 1 mM DTT. La columna se equilibró con el buffer mencionado anteriormente y se le determinó su volúmen vacío usando como marcador azul dextran.

El sobrenadante nuclear, (2-5 ml) conteniendo la RNA polimerasa II libre se dejó pasar por gravedad en la columna y se colectaron fracciones de 0.5 ml ó 1 ml, dependiendo del volúmen de sobrenadante que se llevó a la columna; el contenido de protefina de cada fracción fue determinado usando el método de Bradford, M. (1976). Se tomaron alícuotas de las fracciones del pico de protefina y se llevaron a electroforésis en geles de acrilamida-SDS para su tinción con nitrato de plata o bién transferidos a filtros de nitrocelulosa para su detección usando anticuerpos específicos contra la enzima.

X) CROMATOGRAFIA EN HEPARINA-AGAROSA.

Para la purificación de la RNA polimerasa II libre, tanto de células CV-1 como de hígado de rata, las fracciones eluidas en volúmen vacío de la columna de sephadex G-200 fueron juntadas y llevadas a una columna de heparina-agarosa de aproximadamente 5 ml de volúmen de lecho, equilibrado previamente con buffer TEPGN (10 mM Tris-HCl pH 7.9, 1 mM EDTA, 0.2 mM PMSF, 25% (P/V) glicerol y 0.2 M NaCl), posteriormente, la columna fué lavada con dos volúmenes de buffer TEPGN a una velocidad de flujo de 5 ml/hora.

y la enzima retenida se eluyó con tres volúmenes de columna de un gradiente lineal de 0.2 a 1.2 M de NaCl en buffer TEPGN; se colec taron fracciones de 0.5 ml y el contenido de protefna de cada - - fracción fue determinado usando el método de Bradford, M. (1976), la molaridad de cada fracción fue determinada por conductividad; cuando fue necesario, las fracciones eluidas entre 0.5 y 0.6 M -- se juntaron y se mezclaron con 4 volúmenes del mismo buffer excep to que no contiene glicerol y se llevaron a centrifugar a 40,000- rpm en una ultracentrífuga Beckman rotor 50Ti durante 18 horas a 4°C, con el propósito de empastillar la enzima. La pastilla se re suspendió en 200 µl de buffer A₂₅ conteniendo: 50 mM Tris-HCl pH- 7.9, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTT, 0.2 mM PMSF y 25% (P/V) glicerol, -- para ser sometido a electroforésis en geles de acrilamida-SDS, -- transferido a filtro de nitrocelulosa e incubado con anticuerpos- específicos contra la RNA polimerasa II.

XI) CUANTIFICACION DE PROTEINA.

Para la cuantificación de protefna, se siguió el método -- descrito por Bradford, M. 1976 (53).

1) Preparación del reactivo.- 100 mg de azul de coomassie G-250- se disolvieron en 50 ml de etanol al 95%, a la solución anterior- se le añaden 100 ml de ácido fosfórico al 85% (P/V), la solución- resultante se lleva a un volúmen final de 1 litro. La concentra-- ción final del reactivo es: 0.01 % (P/V) azul de coomassie G-250, 4.7% (P/V) etanol y 8.5% (P/V) ácido fosfórico respectivamente, - la solución se filtra a través de un filtro Whattman 3 MM.

2) Preparación de la solución stock de proteína.- La solución stock de proteína se preparó usando albumina de suero de bovino a una concentración de 1 mg/ml en 0.15 M de NaCl.

Para la estandarización de la curva patrón, se usaron concentraciones de proteína del rango de 5 a 60 μg . El volúmen final se ajustó a 100 μl con una solución de NaCl 0.15 M. A cada tubo se le agregaron 5 ml del reactivo mencionado anteriormente, la solución final se mezcla vigorosamente. Después de dos minutos (tiempo en que se lleva a cabo la reacción del colorante con la proteína), se le mide la absorbancia a 595 nm. La concentración de proteína fue graficada contra la absorbancia correspondiente. A partir de la curva resultante y de la absorbancia encontrada en las muestras a medir, se puede cuantificar la concentración en μg de proteína por ml de muestra.

XII TRANSFERENCIA DE PROTEINAS A FILTROS DE NITROCELULOSA.

Para la transferencia de proteínas a filtros de nitrocelulosa, se siguió la metodología descrita por Towin, et. al., 1979- (54). Después de la electroforésis, el gel fue preparado para la transferencia a filtros de nitrocelulosa. El gel fue transferido por aproximadamente 6 horas a 175 V (voltage constante) en tres litros de buffer conteniendo: 25 mM Tris (Base), 92 mM glicina, 20% (V/V) metanol. La cámara de transferencia se mantuvo en un baño de etanol-agua conteniendo hielo seco para mantener la temperatura en un rango de 20-25°C durante la transferencia. Una vez realizada ésta, el papel se incubó durante toda la noche con

15 ml de buffer WB (0.01 M Tris-HCl pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.5% Triton X-100, 0.2% SDS conteniendo 3% de albumina de suero de bovino, para bloquear los grupos activos del papel.

Después del bloqueo, los papeles se incubaron durante 3 horas con los anticuerpos (150 μ l) contra la RNA polimerasa II en el buffer de incubación conteniendo 1% de albumina (10ml/gel). Después de la reacción, los filtros se lavaron tres veces por períodos de 15 minutos cada lavada usando el buffer de incubación mencionado anteriormente excepto que no contiene albumina. Posteriormente, los filtros se incubaron durante 2 horas, ya sea con la proteína A-125_I ($1-2 \times 10^6$ cpm/gel) ó bien, con un segundo anticuerpo proveniente de chivo contra IgG de conejo y que lleva acoplada peroxidasa. La reacción se realizó en 10 ml del buffer de incubación conteniendo 1% albumina. Posteriormente se lavaron los papeles por una hora con cambios cada 15 minutos. Las proteínas inmunorreactivas fueron visualizadas ya sea por autorradiografía a -70°C en un film para rayos-X Kodak X-Omat AR ó bien se desarrolló el color de la peroxidasa según la metodología descrita en el instructivo adjunto al producto (Bio-Rad 1984).

RESULTADOS.

CARACTERIZACION DE LA RNA POLIMERASA II UNIDA A COMPLEJOS DE TRANSCRIPCION VIRAL DE SV40.

En un intento por caracterizar a la RNA polimerasa II unida a genes activos en transcripción utilizamos al virus SV40 como modelo de estudio dada sus características mencionadas anteriormente. Para este propósito, se siguió la metodología descrita en la figura 6. Después de centrifugar el sobrenadante celular conteniendo los minicromosomas virales sobre un gradiente lineal de sacarosa del 10-40% a 36,000 rpm durante 4 horas a 4°C en una ultracentrífuga Beckman rotor SW40, se colectaron 20 fracciones de aproximadamente 600 µl a partir del fondo del tubo; el patrón de sedimentación de los minicromosomas (fig. 7a) fue el mismo en todos los experimentos. De las fracciones colectadas en la figura 7a, se tomaron alícuotas de algunas de las fracciones y se llevaron a geles de acrilamida-SDS y teñidos con nitrato de plata en un intento por caracterizar a la especie enzimática unida a los complejos de transcripción viral (CTV). Se encontró principalmente un péptido con un peso molecular de 214 Kd que pudiera tratarse de la especie IIA (214 Kd) y una pequeña cantidad de un péptido con un P.M. de 240 Kd que correspondería a la especie IIO de la enzima (fig. 7b). Cuando realizamos el mapeo triptico (ver métodos) para determinar si éstos péptidos son parte de la enzima, encontramos que existe una gran homología entre sí y al mismo tiempo guardan una estrecha relación con la especie IIB de la enzima purificada de timo de ternera (fig. 8); estos resultados con

firman la idea de que los péptidos mencionados (240 y 214 Kd), -
forman parte de la enzima ya que existen evidencias de que estos
péptidos muestran un patrón tríptico semejante entre sí (Dahmus,
M. 1983) (52).

FIGURA 6.- ESQUEMA PARA LA PURIFICACION DE LOS MINICROMOSOMAS
VIRALES DE SV40.

El cultivo de células CV-1, la infección con SV40 y la obtención de la cromatina viral a las 40 horas post-infección se realizó según lo descrito por Gariglio y Cols. (23). A las 20 horas post-infección, se marcó el DNA viral con ^3H -timidina (20 μCi /caja). Se sedimentó la cromatina viral en gradientes de sacarosa del 10-40% en 10 mM Tris-HCl pH 7.0/0.2 mM EDTA/0.4 M NaCl durante 4 horas a 36,000 rpm en un rotor SW40. Se colectaron fracciones de 625 μl por el fondo del tubo y se contaron 20 μl de cada fracción en papeles Whatman 3 MM, los cuales se lavaron 3 veces con TCA al 5% y 1 vez con etanol frío.

CARACTERIZACIÓN DE LA RNA POL II EN GENES ACTIVOS

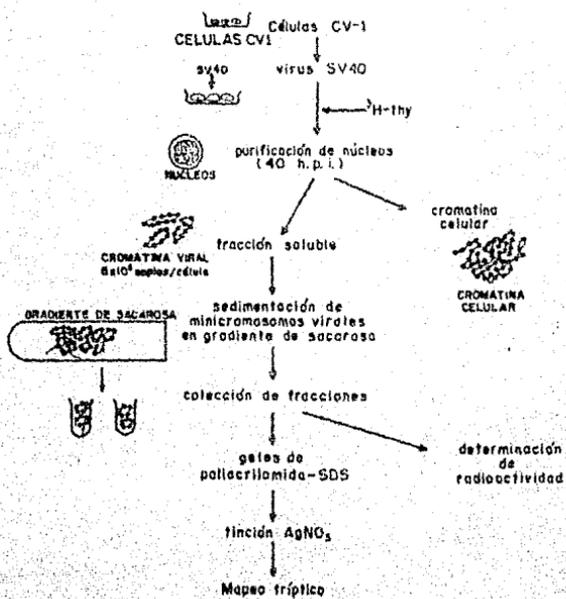


FIGURA 7.- CARACTERIZACION DE LA RNA POLIMERASA II ASOCIADA A
MINICROMOSOMAS TRANSCRIPCIONALMENTE ACTIVOS.

Se utilizaron 115 μ l de las fracciones correspondientes -- del gradiente de sacarosa (panel a), para realizar electroforésis en gel de poliacrilamida-SDS en gradiente (5-17-5%) según lo descrito por Laemmli (49).

Las fracciones 15 y 17 corresponden al tope del gradiente y la fracción 11 a la mayor concentración de minicromosomas de SV40. T.T. contiene enzima purificada de timo de ternera utilizada como marcador de tamaño de las subunidades de la RNA polimerasa II. Los números a la derecha indican el peso molecular en miles de daltones.

El gel se tiñó con nitrato de plata según lo descrito por Wray y cols. (50).

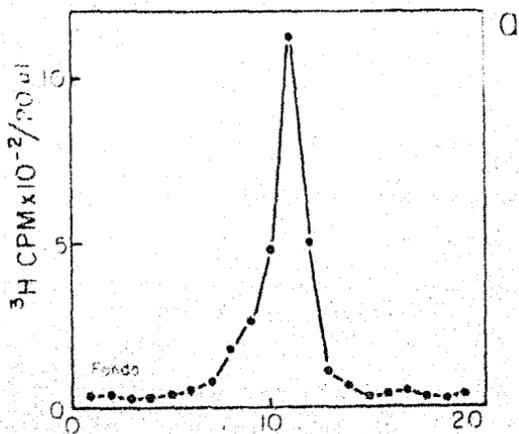


FIGURA 8.- MAPA DE HUELLA DACTILAR (FINGERPRINT) DE LA SUBUNIDAD I1b DE LA RNA POLIMERASA II DE TIMO DE TERNERA Y DE LOS PEPTIDOS DE 214 Y 240 Kd ASOCIADOS AL MINICROMOSOMA.

Las subunidades de la enzima y la fracción correspondiente al pico de DNA viral que se muestra en el gradiente de sacarosa - de la figura anterior se separaron en un gel de poliacrilamida - SDS. La banda de 180 Kd de timo, así como los péptidos de 214 y - 240 Kd asociados al pico de DNA viral, se extrajeron del gel, se marcaron con ^{125}I y la proteína se recuperó como lo describe Tollan (1980).

Se realizó la digestión con tripsina (TPCK) durante 6 horas a 37°C en 50 mM de bicarbonato de amonio pH 8.0. El análisis bidimensional se realizó colocando 2.5×10^4 cpm de la muestra en placas de celulosa y efectuando primero una electroforesis (pH 4.4) - durante 2 horas a 200 V y posteriormente una cromatografía ascendente como lo describe Dahmus (1983).

Las flechas indican la dirección de: E (electroforesis, C - cromatografía).

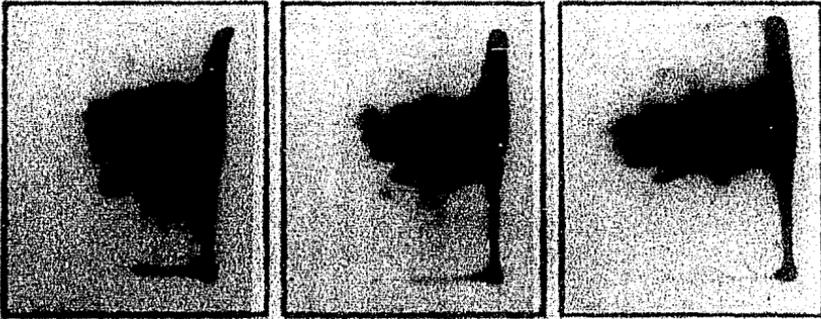
El origen se encuentra abajo, a la derecha.

La placa se expuso durante 4 días a -80°C usando una pantalla intensificadora.

C. T. (180Kd)

C. T. V. (214Kd)

C. T. V. (240Kd)



CROMATOGRAFIA

(-)

ELECTROFORESIS

(+)

CARACTERIZACION DE LA RNA POLIMERASA II LIBRE Y UNIDA, TANTO EN CELULAS CV-1 COMO EN HEPATOCITOS DE RATA.

Por otro lado, basándonos en la metodología descrita por Yu, F. (1975), tratamos de caracterizar a las dos poblaciones enzimáticas presentes en la célula (estas dos poblaciones se conocen como libre y unida a la cromatina). Para ésto, empleamos tanto la línea celular CV-1 como hepatocitos de rata.

Para la separación y caracterización de las poblaciones libre y unida se siguió el protocolo descrito en Métodos y en el esquema de la figura 9 donde se incluye la electroforésis en geles de acrilamida-SDS e inmunodetección en filtros de nitrocelulosa usando anticuerpos específicos contra la enzima. La enzima libre fué también caracterizada por cromatografía en sephadex G-200 y heparina-agarosa.

Cuando analizamos la enzima libre de células CV-1 después de ser pasada a través de la columna de sephadex G-200 (fig.10), encontramos que la enzima eluye en el volúmen vacío de dicha columna. Alícuotas de cada fracción eluidas en el volúmen vacío fueron corridas en geles de acrilamida-SDS y teñidos con nitrato de plata (fig. 11a), o bien transferidos a filtros de nitrocelulosa y detectados con anticuerpos contra la RNA polimerasa II y posteriormente con proteína A-125_I (fig.11b). La tinción del gel con nitrato de plata muestra, mayoritariamente, un péptido con un P.M. de 180 Kd que correspondería a la forma IIB de la enzima; sin embargo, también existe una pequeña cantidad de las formas IIO y IIA. Al analizar el filtro de nitrocelulosa incubado

con anticuerpos contra la enzima y revelado con proteína A-12S₁, se encontró que los anticuerpos reconocen preferencialmente a los péptidos con P.M. de 240, 214 y 180 Kd, además de dos péptidos con pesos moleculares de 90 a 34 Kd respectivamente (fig. -- 11b).

Estos resultados demuestran que los péptidos mencionados anteriormente son componentes de la RNA polimerasa II y, al mismo tiempo, demuestra que la enzima libre está compuesta principalmente por la especie IIB (fig 11a), aunque éste resultado no se puede observar en la fig. 11b ya que existe una sensibilidad diferencial para las subunidades de mayor peso de la enzima de timo de ternera (ver fig. 11b, carriles C.T.), es decir, los anticuerpos reconocen mas fuertemente el péptido de 214 Kd que al de 180 Kd y casi no reconocen al péptido de 140 Kd, (59).

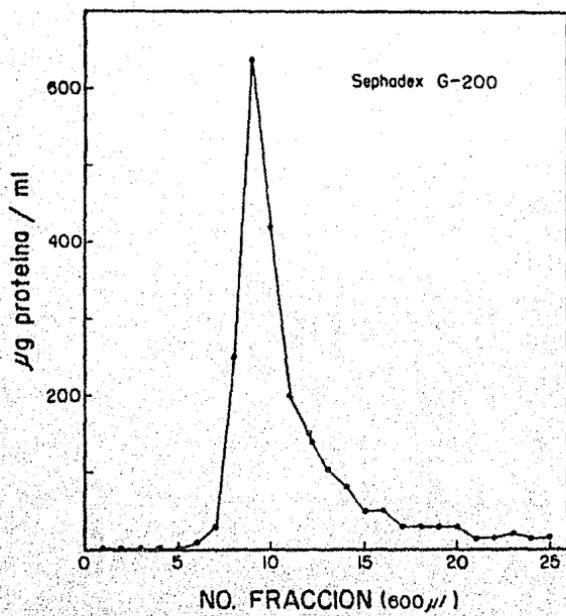
FIGURA 9.- ESQUEMA PARA LA SEPARACION DE LA RNA POLIMERASA II-
LIBRE.

Los núcleos de células CV-1 y hepatocitos de rata fueron obtenidos como se describe en Métodos. Para separar la enzima libre de la asociada, los núcleos fueron resuspendidos en sacarosa 0.34 M y tratado como lo describe Yu, F. (1975). La enzima libre, tanto de células CV-1 como de hepatocitos de rata fueron purificados y caracterizados posteriormente como se muestra arriba o como se describe en Métodos.

FIGURA 10-11.- ANALISIS PEPTIDICO DE LA RNA POLIMERASA II LIBRE-
DE CELULAS CV-1.

Los núcleos de células CV-1 fueron obtenidos como lo describe Gariglio (1979) e incubados en sacarosa 0.34 como se describe en Métodos y en la leyenda de la figura 9. El sobrenadante nuclear, conteniendo la RNA polimerasa II libre, fué pasado a través de una columna de sephadex G-200 como se describe en Métodos. Las fracciones 8-14 (ver gráfica de la figura 10) fueron corridas en geles de acrilamida-SDS y teñidas con nitrato de plata (fig. 11a) o transferidas a filtros de nitrocelulosa para su inmunodetección usando protefna A-125₁ (fig. 11b). Los números en cada carril indican el número de fracción de la gráfica 10 que fueron usadas (80 µl).

C.T.) RNA polimerasa II purificada de timo de ternera y usada como marcador de P.M. de las subunidades.



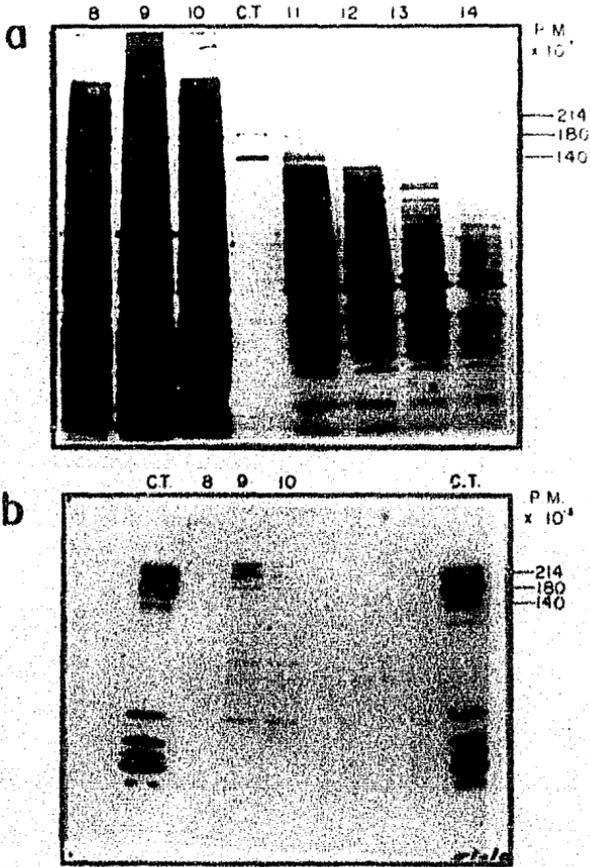


Fig. 11

En un intento por purificar un poco más a la población de enzima libre de células CV-1, las fracciones eluidas en el volumen vacío de la columna de sephadex G-200 (fig. 10), se juntaron y se llevaron a una columna de heparina-agarosa (ver Métodos). Después de lavar la columna con buffer TEPGN, conteniendo 0.2 M de NaCl, la enzima retenida se eluyó con un gradiente lineal de NaCl de 0.2 M a 1.2 M. La fig. 12a muestra el perfil de elución de la enzima, donde además se observa que la enzima eluye a una molaridad de 0.5-0.6 M de NaCl. Cuando analizamos alícuotas de las fracciones de mayor interés en geles de acrilamida-SDS teñidos con nitrato de plata, se encontró que gran parte del péptido de 180 Kd, junto con el péptido de 240 Kd que correspondería a la forma II0, eluyen a 0.2 M de NaCl; mientras que la población de enzima retenida que eluye a 0.6 M, está compuesta por las formas IIA (214 Kd) y IIB (180 Kd); IIC (140 Kd), es un péptido común para las tres especies enzimáticas reportadas (II0, IIA y IIB).

Para determinar si éstos péptidos, retenidos en heparina-agarosa, forman parte de la enzima, las proteínas fueron transferidas a filtros de nitrocelulosa después de haber sido concentradas como se describe en Métodos. 300 μ l de las fracciones 26-30 que eluyen a 0.5-0.6 M NaCl (fig. 13a) fueron juntadas y mezcladas con el mismo buffer (excepto que no contiene glicerol) y, la proteína, fue empastillada por centrifugación a 40,000 rpm durante 18 horas a 4°C en una ultracentrífuga Beckman rotor 50Ti. La pastilla se resuspendió en 200 μ l de buffer A₂₅ conteniendo: 50 mM Tris-HCl pH 7.9, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTT, 0.2 mM

PMSF y 25% glicerol y llevada a electroforésis en geles de acrilamida-SDS y transferidas a filtros de nitrocelulosa, incubado con anticuerpos contra la RNA polimerasa II y posteriormente se usó un segundo anticuerpo de chivo acoplado a peroxidasa dirigido contra IgG de conejo. El resultado presentado en la figura 13 b muestra que el péptido de 214 Kd es reconocido por los anticuerpos, lo que hace pensar que este péptido, retenido por heparina-agarosa, forma parte de la enzima; sin embargo, el péptido de 180 Kd no se observa y esto podría explicarse en parte por la poca cantidad que se retiene de este péptido, así como a la menor sensibilidad de los anticuerpos por este péptido con respecto al péptido de 214 Kd.

Cuando analizamos a la población de enzima que está unida a la cromatina, después de haber sido extraída la enzima libre, la cantidad de núcleos equivalente a 20 cajas de células CV-1 fueron resuspendidos en 5 ml de buffer conteniendo: 10 mM Tris-HCl pH 7.9, 1 M sacarosa, 5 mM $MgCl_2$ y 20 mM β -mercaptoetanol; alícuotas de la suspensión anterior fueron tratadas bajo diferentes condiciones, como se muestra en la figura 14, y corridas en geles de acrilamida-SDS. Posteriormente se transfirieron a filtros de nitrocelulosa, incubados con anticuerpos contra la enzima y revelado con un segundo anticuerpo de chivo acoplado a peroxidasa dirigido contra IgG de conejo. Como se muestra en la figura 14, se encontró que la enzima unida está compuesta principalmente por la especie II0 y sólo una pequeña cantidad, de la especie IIA (carriles 1 y 2). Asimismo, se observó que cuando sonificamos los núcleos durante 40 segundos en presencia de sarkosyl,

gran parte de la especie 110 se pierde (carril 3). Este efecto - se debe a la sonicación de los núcleos ya que otra alícuota de - núcleos, en presencia de sarkosyl, pero sin sonicar, no muestra - el mismo efecto (carril 4).

FIGURA 12.- CROMATOGRAFIA EN HEPARINA-HAGAROSA DE LA RNA POLIME
RASA II LIBRE DE CELULAS CV-1.

El pico de proteína obtenido en el volúmen vacío de la columna de sephadex G-200 (ver fig. 10) fue llevado a una columna de heparina-agarosa como se describe en métodos.

- a) Perfil de elución de la proteína.
- b) Tinción del gel con nitrato de plata.

Los números de cada carril representan la fracción correspondiente eluidas en la columna (panel a).

Cada carril contiene 100 μ l de muestra.

- p) 20 μ l del pico de proteína obtenido de la columna de sephadex G-200 que fué llevado a la columna de heparina-agarosa.

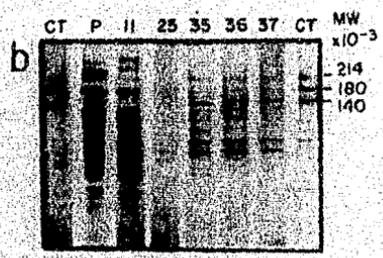
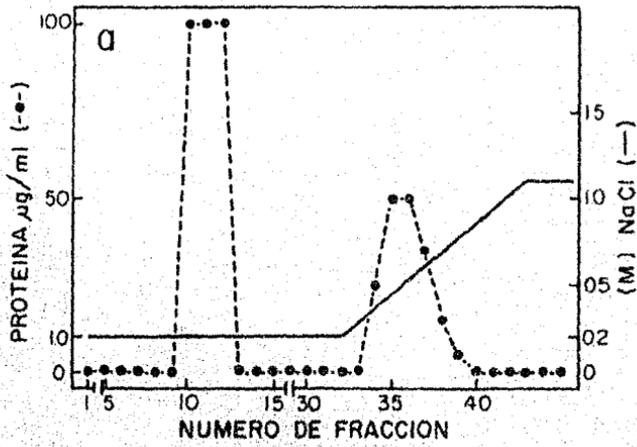


FIGURA 13.- INMUNODETECCION DE LAS SUBUNIDADES DE LA RNA
POLIMERASA II EN FILTROS DE NITROCELULOSA.

El experimento fué hecho siguiendo el procedimiento descrito en la leyenda de la figura 12.

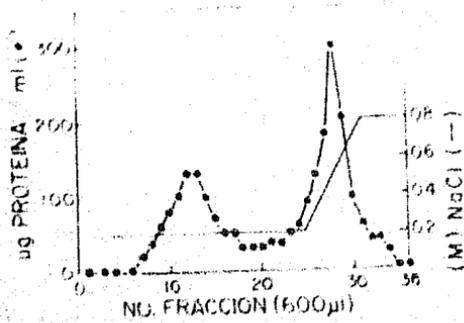
Con el propósito de concentrar el pico de proteína que eluye a 0.5-0.6 M NaCl, alícuotas de 300 μ l de las fracciones 26-30- (panel a), se juntaron y mezclados con 4 volúmenes del mismo buffer, sin glicerol, y centrifugado durante 18 horas a 40,000 rpm a 4°C en una ultracentrífuga Beckman, rotor 50 Ti. La pastilla -- fué resuspendida en 200 μ l de buffer A₂₅ conteniendo 0.2 mM PMSF.

b) Análisis de las subunidades enzimáticas por inmunodetección en filtros de nitrocelulosa.

1 y 2) 100 y 50 μ l respectivamente de la pastilla resuspendida.

C.T.) RNA polimerasa purificada de timo de ternera usada como marcador de P.M de las subunidades.

d



b

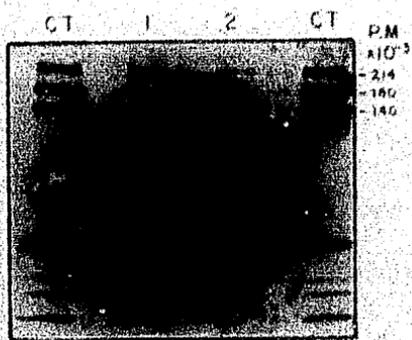


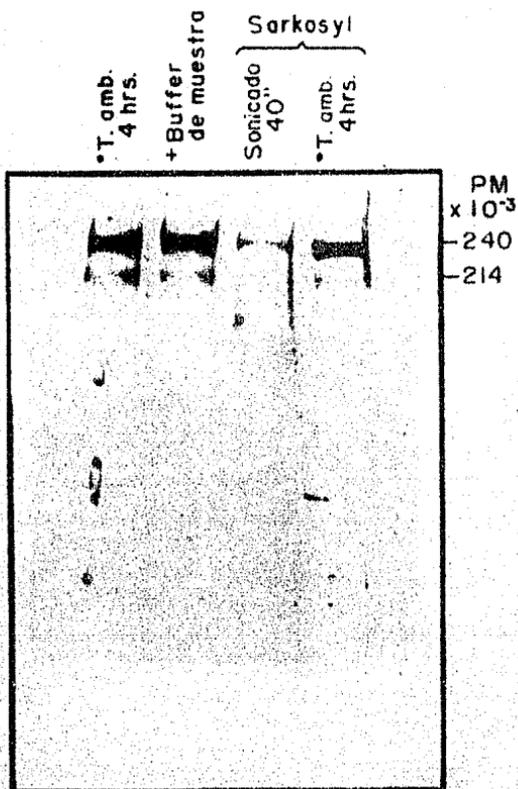
FIGURA 14.- COMPOSICION PEPTIDICA DE LA RNA POLIMERASA II UNIDA
A LA CROMATINA DE CELULAS CV-1.

Los núcleos de células CV-1, luego de haber sido extraída la RNA polimerasa II libre, fueron resuspendidos como se describe en Métodos. La suspensión se fraccionó para ser ensayada bajo diferentes condiciones y, posteriormente, se tomaron alícuotas de cada fracción para ser llevadas a geles de acrilamida- - SDS, y transferidas a filtros de nitrocelulosa. La enzima fue detectada usando anticuerpos y posteriormente, se usó un segundo anticuerpo de chivo acoplado a peroxidasa y dirigido contra-IgG de conejo.

Cada carril contiene 100 µl de muestra tratadas bajo las condiciones señaladas en cada carril.

Los números a la derecha indican el P.M. en miles de daltones.

NUCLEOS DE CELULAS CV-1



Cuando analizamos la composición peptídica de la RNA polimerasa II libre, obtenida de núcleos de hígado de rata, encontramos que la enzima está compuesta principalmente por la especie IIB que tiene un P.M. de 170 Kd en este organismo (fig.15a, carril S.N.). Después de pasar esta fracción por cromatografía en sephadex G-200, encontramos que este péptido eluye en volúmen vacío de dicha columna (ver figura 15). Las fracciones 8-14 se juntaron y se tomaron alícuotas para ser corridas en geles de acrilamida-SDS y teñidas con nitrato de plata (fig.15a) o bien transferidas a filtros de nitrocelulosa e incubadas con anticuerpos contra RNA polimerasa II para su inmunodetección (fig.15b).

Se encontró que el péptido mayoritario de 170 Kd, observado por tinción con nitrato de plata (fig. 15a), forma parte de la enzima (fig. 15b). Asimismo, se encontró que existe una pequeña cantidad de la especie IIA que no es visible por tinción con nitrato de plata. El resto de las fracciones que se juntaron (8-14) fué llevado a una segunda cromatografía en heparina-agarosa. Después de lavar la columna con buffer TEPGN conteniendo 0.2 M de NaCl, la enzima se eluyó con un gradiente lineal de NaCl de 0.2 a 1.2 M; el perfil de elución de la enzima se muestra en la gráfica de la figura 16, donde se observa que un pequeño pico de proteína eluye a una molaridad de NaCl entre 0.5 y 0.6 M; sin embargo, al tratar de analizar la composición peptídica de esta población proteica, no fuimos capaces de observarlo dada la poca cantidad de proteína retenida. Por otro lado, cuando analizamos la composición peptídica del pico de proteína que eluye a --

0.2 M. de NaCl, encontramos que existe una gran cantidad de la especie IIB que eluye a esta molaridad (fig. 16a y b).

El siguiente objetivo fué comparar el patron peptídico de las dos poblaciones enzimáticas (libre y unida a la cromatina) de hígado de rata. La figura 17a y b muestra que la enzima libre está compuesta principalmente por la forma IIB (170 Kd), mientras que la enzima unida es rica en la especie IIO y también existe una pequeña cantidad de la especie IIA (214 Kd). Este resultado es similar al encontrado en células CV-1.

FIGURA 15.- ANALISIS PEPTIDICO DE LA RNA POLIMERASA II LIBRE DE
HIGADO DE RATA.

Los núcleos de hígado de rata fueron obtenidos e incubados en sacarosa 0.34 M como se describe en métodos y en la leyenda de la figura 9. Después de la extracción, el sobrenadante nuclear (SN) conteniendo la RNA polimerasa II libre, fué pasado a través de una columna de sephadex G-200 (ver figura 15). Las fracciones que eluyen en volumen vacío (Fx 8-14), fueron juntas y analizadas. Alícuotas de esta fracción fueron corridas en geles de acrilamida-SDS y teñidos con nitrato de plata (panel a) o bien transferidas a filtros de nitrocelulosa (panel b) e incubados con anticuerpos de conejo contra RNA polimerasa II purificada de timo de ternera, seguido por un segundo anticuerpo contra IgG de conejo conjugado a peroxidasa, y revelado como se describe en métodos.

SN) 120 μ l de sobrenadante nuclear.

A y B) 120 y 30 μ l respectivamente de la población de proteína que eluye en volumen vacío de la columna de sephadex G-200., C.T.) RNA polimerasa II purificada de timo de ternera y usada como marcador de P.M. de las subunidades.

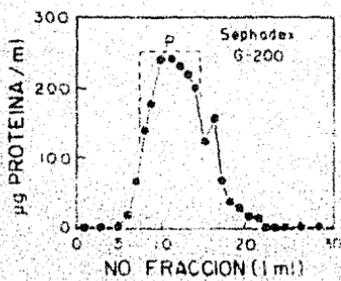
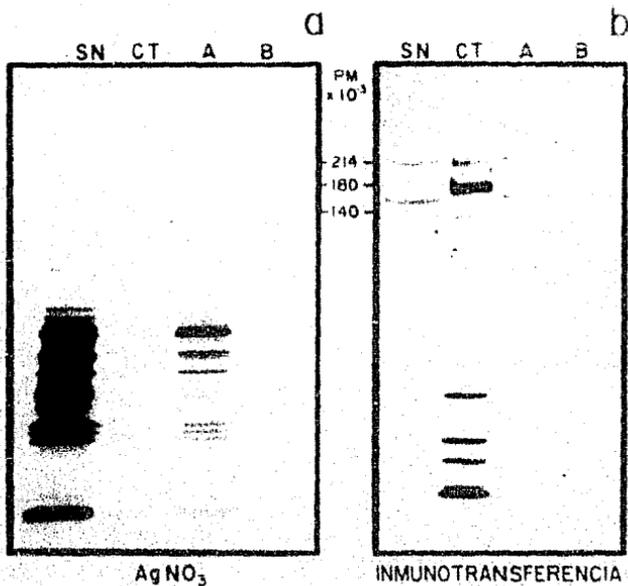
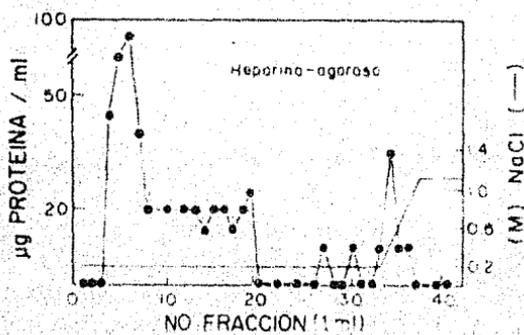
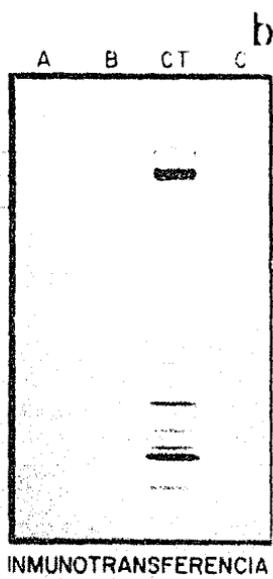
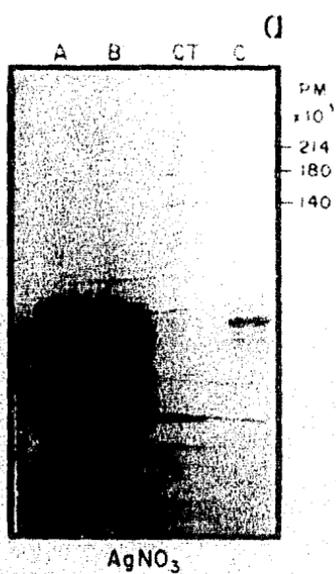


FIGURA 16.- CROMATOGRAFIA EN HEPARINA-AGAROSA DE LA RNA
POLIMERASA II LIBRE DE HIGADO DE RATA.

1.0 mg de proteína que eluye en volumen vacío de la columna de sephadex G-200 (ver gráfica de la figura 15), fue llevado a una columna de heparina-agarosa equilibrado previamente en buffer TEPGN (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.2 mM PMSF, 25% (P/V) glicerol y 0.2 M NaCl). Posteriormente, la columna se lavó con 15 ml de buffer TEPGN y la enzima fue eluida con un gradiente lineal de 0.2-1.5 M de NaCl en el mismo buffer.

El perfil de elución de la proteína se muestra en la gráfica. Alícuotas del pico de proteína que eluyen a 0.5-0.6 M (fracción 34) y 0.2 M (fracciones 5 y 6) fueron corridas en geles de acrilamida-SDS y teñidas con nitrato de plata (panel a), o bien, transferidas a filtros de nitrocelulosa y probadas con anticuerpos específicos contra la enzima (panel b).

A) 120 μ l de la fracción 5; B) 120 μ l de la fracción 6; C) 120 μ l de la fracción 34; CT) RNA polimerasa II purificada de timo de ternera usada como marcador de P.M. de las subunidades.



SOLUBILIZACION DE LA RNA POLIMERASA ASOCIADA A LA CROMATINA, USANDO EL DETERGENTE SARKOSYL.

En un intento por caracterizar a la especie enzimática activa en transcripción, la población de enzima unida a la cromatina fué resuspendida en 10 mM Tris-HCl pH 7.9, 1 M sacarosa, 5 mM $MgCl_2$ y 20 mM B-mercaptoetanol en presencia de 1% de sarkosyl. Este detergente aniónico desprende todas las proteínas unidas al DNA, pero respeta a la RNA polimerasa activa en transcripción (43). La suspensión fué incubada durante 10 minutos a 4 y 30°C respectivamente. Posteriormente, la suspensión se centrifugó a 20,000 rpm durante 20 minutos a 4°C en una ultracentrífuga Beckman, rotor SW50.1 con el propósito de caracterizar a la especie enzimática que se desprende con esta concentración del detergente. La pastilla cromatínica se resuspendió en el mismo buffer y se tomaron alícuotas de ésta y del sobrenadante de 1% de sarkosyl, para ser corridas en geles de acrilamida-SDS y teñidas con nitrato de plata (fig. 18a), o bien transferidas a filtros de nitrocelulosa para su inmunodetección (fig. 18b).

Se encontró que una gran cantidad de la forma IIO (aproximadamente el 80%) se desprende de la cromatina junto con la totalidad de la especie IIA, quedando sólo una pequeña cantidad de la forma IIO (20%) unida a la cromatina; éstos resultados parecen indicar que la especie enzimática transcripcionalmente activa en núcleos de hígado de rata, está compuesta principalmente por la especie IIO.

FIGURA 17.- COMPOSICION PEPTIDICA DE LA RNA POLIMERASA II LIBRE
Y UNIDA A LA CROMATINA EN NUCLEOS DE HIGADO DE RATA.

La RNA polimerasa libre y unida a la cromatina de hígado de rata, fueron separadas siguiendo la metodología descrita por Yu, F. (1975) (ver figura 9 y Métodos). Alícuotas, tanto de la pastilla de cromatina, conteniendo la enzima unida (resuspendida como se describe en métodos), y del sobrenadante de 0.34 M de sacarosa (conteniendo la enzima libre), fueron corridas en geles de acrilamida-SDS y teñidas con nitrato de plata o bien transferidas a filtros de nitrocelulosa y analizadas como se describe en métodos.

PN) 100 μ l de la pastilla nuclear conteniendo la enzima unida.

SN) 100 μ l del sobrenadante de 0.34 M de sacarosa conteniendo la enzima libre.

CT) RNA polimerasa II purificada de timo de ternera y usada como marcador de P.M. de las subunidades.

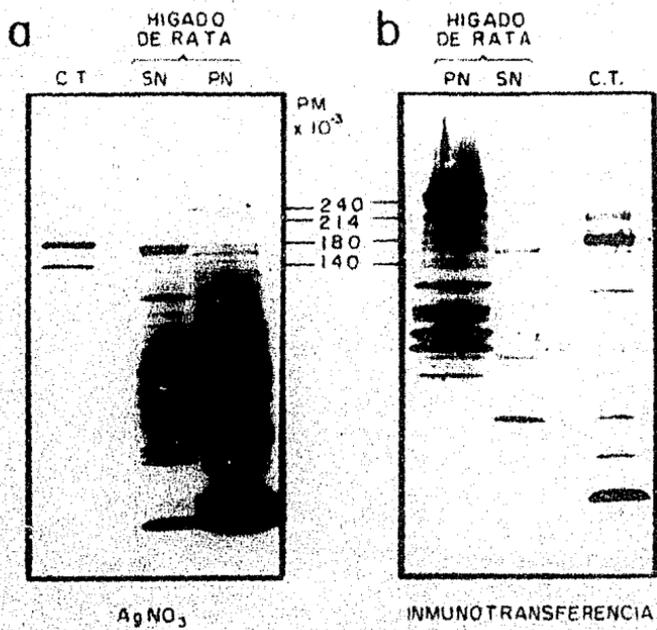


Fig. 17

FIGURA 18.- CARACTERIZACION DE LA RNA POLIMERASA II UNIDA A GENES ACTIVOS DE NUCLEOS DE HEPATOCITOS DE RATA USANDO EL DETERGENTE SARKOSYL.

Después de haber extraído la RNA polimerasa II libre, a partir de núcleos purificados, la cantidad de núcleos equivalentes a 10 g de hígado se resuspendió en 5 ml de buffer como se describe en métodos.

De la suspensión nuclear, conteniendo la RNA polimerasa unida, se tomaron dos alícuotas de 1.5 ml y se le agregó sarkosyl a una concentración final de 1% incubándose a 4°C y 30°C durante 10 minutos. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 20,000 rpm durante 20 minutos a 4°C en un rotor SW50.1. Se tomaron alícuotas, tanto del sobrenadante como de la pastilla para ser corridas en geles de acrilamida-SDS y teñidas con nitrato de plata (a), o bien transferidas a filtros de nitrocelulosa para ser detectadas usando anticuerpos contra la enzima (b) (ver Métodos).

P) 100 µl de la pastilla de cromatina después de ser tratadas con 1% de sarkosyl.

S. Nuclear) 100 µl del sobrenadante de 1% de sarkosyl.

N) 100 µl de núcleos conteniendo solamente la enzima unida.

C.T.) RNA polimerasa II purificada de timo de ternera y usada como marcador de peso de las subunidades.

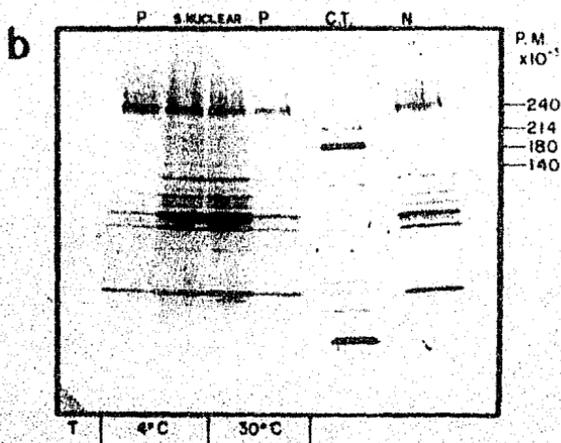
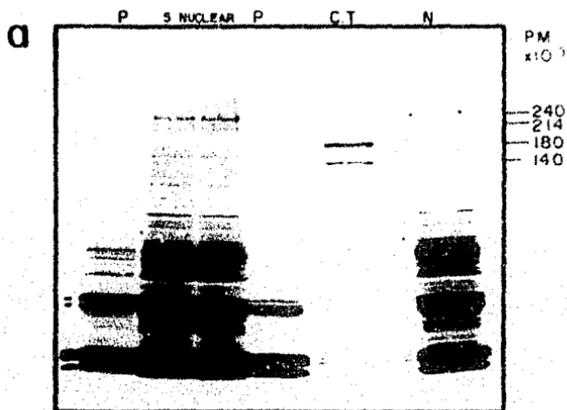


Fig. 18

DISCUSION.

En este trabajo se trató de caracterizar a las dos poblaciones de RNA polimerasa II presentes tanto en células CV-1 como en núcleos de hepatocitos de rata. Estas dos poblaciones se conocen como libre y unida, respectivamente; se sabe que la enzima libre es activa para templados exógenos y que esta población representa aproximadamente el 50% de la población total de la enzima presente en la célula (48). Nosotros encontramos que: a) esta población es rica en la especie IIB; b) que en células CV-1, el péptido mayor, tiene un peso molecular aproximado de 190 Kd mientras que en núcleos de hígado de rata tiene un P.M. de 170 Kd (55). Se han usado diferentes criterios para la caracterización de la población libre como son: La cromatografía en sephadex-G-200 y heparina-agarosa; esta última resina es un análogo de ácidos nucleicos y por lo tanto, las proteínas con afinidad a los ácidos nucleicos (DNA o RNA), se retienen en esta columna; sin embargo, se ha visto que gran parte de esta población no se retiene a 0.2 M de NaCl, indicando que esta especie (IIB) tiene poca afinidad por el DNA, lo cual coincide con su estado (libre) en la célula.

Por otro lado, creemos que el uso de anticuerpos dirigidos contra la enzima es un método directo para caracterizar la estructura de las poblaciones enzimáticas presentes en la célula.

Utilizando esta última metodología, se encontró que la enzima unida a la cromatina está compuesta principalmente por la especie IIO. Esta especie está unida fuertemente a la cromatina y al parecer, es la especie que está activa en transcripción da-

do que no se desprende totalmente de la cromatina cuando ésta es tratada con altas concentraciones (1 %) de sarkosyl a diferencia de la especie IIA que se desprende totalmente mediante este tratamiento. Parece ser que la especie IIO se destruye fácilmente cuando el tejido es sonicado para la purificación de la enzima (fig. 14). Este fenómeno podría explicar, al menos en parte, la presencia mayoritaria de dos especies diferentes de la enzima (IIA y IIB) en las purificaciones convencionales. Además, la poca afinidad de la especie IIB por algunas resinas, podría explicar la baja eficiencia de recuperación de la enzima en las purificaciones.

Se ha sugerido fuertemente (56, 57, 58), la existencia de proteasas capaces de producir una proteólisis específica de la especie IIO como un mecanismo para la existencia de las tres especies encontradas y, que ésta proteólisis, ocurre durante la extracción y purificación de la enzima; sin embargo, nuestros resultados sugieren que in vivo, existen al menos dos especies siendo éstas IIO y IIB. Aunque IIB pudiera ser producto de una proteólisis parcial de la especie IIO, ésta proteólisis es específica y de alguna manera podría estar relacionada con los eventos de iniciación, elongación y terminación de la transcripción, ya que se sabe que la especie IIB es capaz de transcribir DNA purificado de timo de ternera, pero es incapaz de reconocer específicamente el sitio de iniciación de genes celulares (regiones promotoras); al mismo tiempo, se sabe que anticuerpos producidos contra las especies IIO y IIA inhiben la iniciación específica -

de la transcripción de promotores virales y celulares en sistemas in vitro. (35).

En base a nuestros resultados y a los antecedentes mencionados, pensamos que la especie IIO está implicada en el reconocimiento de regiones promotoras de genes específicos que son o, serán transcritos mientras que la especie IIB estaría relacionada con los procesos de elongación y/o terminación.

Poco se sabe de la especie IIA en sistemas in vivo, aunque se ha reportado que constituye el 45% de las tres especies reportadas en las purificaciones convencionales de la enzima. Nosotros hemos encontrado muy poca cantidad de esta especie en nuestros sistemas de estudio, ya sea en la población que se encuentra en forma libre como la unida a la cromatina. Sin embargo, no se sabe si esta heterogeneidad en la distribución de esta especie, sea real o se deba a un artefacto de la metodología empleada. También existe la posibilidad de que sea un producto intermedio en la conversión de la especie IIO a IIB (si es que esto ocurre); también pudiera ser una forma más estable de la especie IIO; lo que si es claro, es que guarda una estrecha relación con las otras dos especies (IIO y IIB) y que anticuerpos dirigidos contra las subunidades mayores de cada especie reconocen más fuertemente al péptido IIA (214 Kd) con respecto al péptido IIB (180 Kd) (59).

Además, anticuerpos dirigidos contra este péptido (IIa), reconocen fuertemente al péptido más grande de la especie IIO con un P.M. aproximado de 240 Kd (resultados no presentados). Además de estos resultados, los resultados presentados en las fi

guras 7 y 8, parecen indicar que la especie IIA, está asociada -- a genes que son o están potencialmente activos en transcripción.

Cabe mencionar también que el hecho de que anticuerpos dirigidos contra RNA polimerasa II de timo de ternera, reconozcan fuertemente a la enzima de otras especies como son mono (para la línea celular CV-1) y rata, apoya fuertemente la hipótesis de que la enzima está muy conservada en los organismos eucariontes (60).

El uso de anticuerpos específicos contra la enzima, ofrece la posibilidad de realizar estudios más directos sobre la composición de la enzima en diferentes estadios del desarrollo de especies tanto animales como vegetales, además de ofrecer una alternativa como método de purificación de la enzima.

REFERENCIAS.

- 1) O'Malley, B.W. (1977). *Ann. Rev. Genet.* 11: 239-275.
- 2) Kornberg, R.D. (1974). *Science.* 184: 868-871.
- 3) Worcel, A. (1977). *Symp. Quant. Biol. COLD SPRING HARBOR.* 42: 313-324.
- 4) Kornberg, R. (1977). *Ann. Rev. Biochem.* 46: 931-954.
- 5) Finch, J.T. & A. Klug (1976). *Proc. Nat. Acad. Sci.* 73: - 1897-1901.
- 6) Laemmli, U.K., Cheng, S.N., Adolph, K.W., Palulson, J.R. Brown, J.A. & W.R. Baumbach (1977). *Symp. Quant. Biol. COLD SPRING HARBOR.* 42: 351-360.
- 7) Watson, J.D. (1978). *Biología Molecular del Gen.* 3a. Ed. Fondo Educativo Interamericano, España.
- 8) Bonner, J., Wallace, R.B., Sargent, T.D., Murphy, R.F. & K. Dube (1977). *Symp. Quant. Biol. COLD SPRING HARBOR.* - 42: 851-857.
- 9) Peterson, J.L. & E.H. McConkey (1976). *J. Biol. Chem* - - 251: 548.
- 9) Wray, W., Mace, M., Daskal, Y. & E. Stubblefield (1977). *Symp Quant. Biol. COLD SPRING HARBOR.* 42: 361-365.
- 10) Levitt, A., Axel, R. & H. Cedar (1979). *Develop. Biol.* - 69: 496-505.
- 11) Losik, R. & Chamberlin (1976). *RNA. polimerase. COLD - - SPRING HARBOR.*
- 12) Chambon, P. (1977). *Symp. Quant. Biol. COL. SPRING HARBOR* 42: 1209-1234.
- 13) *Molecular Mechanisms in the Control of Gene Expression* (1976). ICN-UCLA.

- 14) Weintraub, H. & Groudine, M. (1976). *Science*. 193: 848-856.
- 15) Paul, J., Zollner, E.J., Gilmour, R.S. & G.D. Birnie (1977)-
Symp. Quant. Biol. COLD. SPRING HARBOR. 42: 597-605.
- 16) Garci, A. & R. Axel (1977). *Symp Quant. Biol. COLD SPRING-
HARBOR*. 42: 701-708.
- 17) Levy, B., Wong, N.C., Watson, D.C., Peters, E.H. & G.H. Dixon
(1977). *Symp. Quant. Biol. COLD SPRING HARBOR*. 42: 793-801.
- 18) Stein, G.S., Stein, J.L. & A. Thomson (1978). *Cancer Research*
38: 1181-1201.
- 19) O'Malley, B.W., Tsai, M.J., Tsai, S.Y. & H.C. Towle (1977)-
Symp. Quant. Biol. COLD SPRING HARBOR. 42: 605-615.
- 20) O'Malley, B.W. & A.R. Means (1974). *Science*. 183: 610-620.
- 21) Jacob, J.T., Janne, O. & E.M. Sajdel-Sulkowska (1975). *Isozymes. Developmental Biology*. 3: 9-23. Academic Press.
- 22) Brown, D.D. (1981). *Science*. 211: 667-674.
- 23) Mathis, D., Oudet, P. & P. Chambon (1980). *PNARMB*. 24: 1-55.
- 24) Gariglio, P., Llopis, R., Oudet, P. & P. Chambon (1979). *J. -
Mol. Biol.* 131: 75-105.
- 25) Widnell, C.C. & J.R. Tata (1966). *Biochem. Biophys Acta*. 125:
478-
- 26) Maul, G.G. & T.H. Hamilton (1967). *Proc. Nat. Acad. Sci.* 57:
1371-
- 27) Stirpe, F. & L. Fiume (1967). *J. Biochem.* 105: 779-
- 28) Roeder, R.G. & W.J. Rutter (1969). *Nature*. 224: 234-237.
- 29) Kedinger, C., Nauret, P. & P. Chambon (1971). *FEBS. Lett.* 15:
169-174.

- 50) Lewis, M.K. & R.R. Burgess (1982). *The Enzymes*. 3a Ed. Vol SV Academic Press, N.Y. pp: 109-153.
- 31) Kedinger, C., Gissinger, F. & P. Chambon (1974). *Eur. J. Biochem.* 44: 421-436.
- 32) Christmann, J.L. & M.E. Dahmus (1981). *J. Biol. Chem.* 256: 3326-3331.
- 33) Dahmus, M.E. & C. Kedinger (1983). *J. Biol. Chem.* 258: 2303-2307.
- 34) Stein, H. & P. Hausen (1970). *Eur. J. Biochem.* 14: 270-277.
- 35) Seifart, K. H. (1970). *Symp. Quant. Biol. COLD SPRING HARBOR.* 35: 719-725.
- 36) Lee, S.C. & M.E. Dahmus (1973). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 70: 1383-1387.
- 37) Dahmus, M.E. (1981). *J. Biol. Chem.* 256: 3332-3339.
- 38) Dahmus, M.E. (1976). *Biochemistry.* 15: 1821-1829.
- 39) Tooze, J. (1980). *Molecular Biology of Tumor Viruses*. 2a Ed. Part. 2. COLD. SPRING HARBOR LABORATORY.
- 40) Lebowitz, P. & S.M. Weissman (1979). *Current Topics in Microbiology & Immunology*. 87 Springer-Verlag.
- 41) Griffith, J.D. (1975). *Science.* 187: 1202-1203.
- 42) Llopis, R., Perrin, F., Bellard, F. & P. Gariglio (1981). *J. Virol.* 38: 82-90.
- 43) Gariglio, P. & S. Mousset (1975). *FEBS Lett.* 56: 149-155.
- 44) Righthand, V. & J. C. Bashaw (1979). *Intervirology.* 4: 162-170.

- 45) Gariglio, P., Buss, J. & M.E. Green (1974). FEBS Lett. 44: -
350-353.
- 46) Green, M.E., Buss, J. & P. Gariglio (1975). Eur. J. Biochem. -
53: 217-225.
- 47) Yu, F.L. (1974). Nature. 251 344-346.
- 48) Yu, F.L. (1975). Biochim. et Biophys Acta. 395: 329-336.
- 49) Laemmli, U.K. (1976). Nature. 227: 680-685.
- 50) Wray, W., Boulikas, F., Wray, V.P. & R. Hancock (1981). Anal.
Biochem. 118: 197-203.
- 51) Tolan, D.R., Lambert, J.R., Boileau, G., Fanning, T.G. Kenny
J.W., Vassos, A. & R.R. Traut. (1980). Anal. Biochem. 103: -
101-109.
- 52) Dahmus, M.E. (1983). J. Biol. Chem. 258: 3956-3960.
- 53) Bradford, M. (1976). Anal. Biochem. 72: 248-254.
- 54) Towbin, H., Staehelin, T. & J. Gordon (1979). Proc. Nat. - -
Acad. Sci. USA, 76: 4350-4354.
- 55) Chambon, P. (1975). Ann. Rev. Biochem. 44: 613-638.
- 56) Cruces, J. Diaz, V., Quintanilla, M., Renart, J. & J. Sebas-
tian (1984). Eur. J. Biochem. 141: 279-282.
- 57) Guilfoyle, T., Hagen, G. & S. Malcom (1984). J. Biol. Chem. -
259: 649-653.
- 58) Greenleaf, A.L., Haars, R. & E.K. Bautz (1976). FEBS Lett. -
71: 205-208.
- 59) Carroll, S.B. & D. Stollar (1983). J. Mol. Biol. 170: 777- -
790.
- 60) Guilfoyle, T.J., Hagen, G. & S. Malcom (1983). J. Biol. Chem.
259: 640-648.