



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MEXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA**

**"INMUNODETECCION DE PROTEINAS ANTIGENICAMENTE
RELACIONADAS CON EL PRODUCTO DEL ONCOGENE
c-myc Y SU POSIBLE IMPLICACION EN
REPLICACION Y/O TRANSCRIPCION"**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
JOSE EFRAIN GARRIDO GUERRERO

MEXICO, D. F.

1988



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Patricio Gariglio V. por brindarme la oportunidad de realizar este proyecto en el laboratorio a su cargo en el Departamento de Genética y Biología Molecular. Así mismo, deseo agradecer al M.en C. Alejandro García Carrancá su valiosa asesoría, y de manera muy especial a los Biólogos Erwin Silva, Victor LLaca, Enrique Miranda y Pedro Chavez, y al P. de B. Luis Marat Alvarez, por su amistad y apoyo incondicional y desinteresado durante el desarrollo de este trabajo.

DEDICATORIA

A mis padres Josefina y Efraín por brindarme su apoyo y confianza durante todos estos años y por darme la oportunidad de vivir con la responsabilidad de ser libre en la elección de mi propio camino.

A mis amigos Bertha Hashimoto, Rafael Jiménez y Humberto Lanz, por su sincera amistad y constante estímulo aún en los momentos difíciles.

A mis hermanos Laura, Norma, Verónica, Gabriela, Luis Humberto y Enrique, por comprender y apoyar cada actividad emprendida.

A mis compañeros de grupo, de cuya compañía disfruté durante varios años y a quienes llegue a apreciar como si formaran parte de mi familia.

A la persona que ha decidido compartir
conmigo todos los momentos de mi vida, a
July.

A todas esas personas que como yo, enfrentan
las dificultades de la vida, con la seguridad
de vencerlas y triunfar en un mundo que no
comprendemos y que no nos comprende.

INDICE

INDICE	1
RESUMEN	3
INTRODUCCION	4
Cancer y Oncogenes	4
El gene c-myc y su producto	9
El virus SV40	17
Replicación del virus	21
Transcripción de SV40.....	23
OBJETIVOS Y ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	25
MATERIAL Y METODOS	27
Descongelamiento de Líneas Celulares.....	27
Pasaje de Líneas Celulares	28
Análisis de Lotes de Virus por Microscopia Electrónica.....	29
Propagación del Virus SV40	30
Extracción de ADN viral por el método de Hirt.....	32
Cuantificación de ADN por el método de Burton.....	34
Titulación del virus SV40 por ufp	35
Extracción de Complejos Nucleoprotéicos de SV40.....	36
Cuantificación de Cromatina de SV40 por el método de agarosa en placas.....	39
Tratamiento de Complejos Nucleoprotéicos de SV40 con ARNasa A.....	40

Obtención de Complejos Nucleoprotéicos de SV40	
Activos en Replicación.....	40
Análisis Electroforético de ADN de SV40 en gel	
de Agarosa.....	41
Fluorografía y Autoradiografía de geles de	
Agarosa.....	42
Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS en	
gradiente lineal del 5 al 17.5 %.....	43
Electrotransferencia de proteínas del gel de	
poliacrilamida a filtros de nitrocelulosa.....	46
Tinción de geles de poliacrilamida.....	47
Inmunodetección de proteínas en filtro de	
nitrocelulosa.....	48
Marcaje de proteína A Staphylococcal con 125-I.....	50
RESULTADOS.....	52
DISCUSION	85
CONCLUSIONES.....	94
FIGURAS	96
ABREVIATURAS	101
BIBLIOGRAFIA	103

RESUMEN

Por medio de la metodología de electrotransferencia e inmunodetección utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos contra diferentes secuencias de aminoácidos del producto del oncogene c-myc se detectaron varias proteínas antigenicamente relacionadas con éste en lisados totales de las líneas celulares HeLa y CV-1, en fracciones nuclear y citoplásmica de cels CV-1 y en minicromosomas extraídos de células infectadas con el virus SV-40.

Una de estas proteínas antigenicamente relacionadas con el producto del gene c-myc, con una Mr de 48 Kd, mostró la mayoría de las características descritas hasta hoy para la proteína c-myc, como son su localización mayoritariamente nuclear y su afinidad por ADN de doble cadena. Se observó además a esta proteína unida a ARN viral.

Otra de las proteínas, con una Mr de 67 Kd, permaneció inafectada a tratamiento de los minicromosomas con ARNasa A y fué detectada en los Minicromosomas Activos en Replicación inmunoprecipitados con proteína p-32 del fago T4 y anticuerpos dirigidos contra ella, lo que sugiere que esta proteína puede estar involucrada en la Replicación de los Minicromosomas de SV-40.

INTRODUCCION

CANCER Y ONCOGENES

Actualmente el cáncer ocupa uno de los cinco primeros lugares como causa de defunción en muchos países. En países subdesarrollados este valor aumenta hasta más de un 10% (28), porcentaje que seguramente se incrementará en los próximos años con la erradicación de las enfermedades infecciosas y el aumento del promedio de vida de la población. El cáncer ocurre principalmente en personas en edad productiva que va de los 30 a los 60 años y se observa una estrecha relación entre la incidencia de éste en la población humana y factores como la situación socioeconómica, la zona geográfica y el medio de vida.

Generalmente se acepta que el cáncer se origina a través de la acumulación de algunos cambios que afectan el control del crecimiento celular.

Con el reciente auge de la Biología Molecular, se ha efectuado uno de los avances más espectaculares en relación al mecanismo molecular que hace que una célula normal se transforme en cancerosa; dichos estudios permiten distinguir al menos tres grupos principales de genes que participan en la progresión de un proceso tumoral. El primer grupo lo constituyen los Oncogenes, los cuales pueden inducir una transformación cuando son transferidos a cultivos celulares.

Un segundo grupo lo constituyen los genes "supresores de tumores" o "Anti-oncogenes", que son genes que favorecen neoplasias cuando estan deletados o incapacitados funcionalmente; un ejemplo de estos es el gene *rb-1*, del cual se pierden ambos alelos en células tumorales de retinoblastoma. Se sugiere que este gene puede tener normalmente una función regulatoria, posiblemente en la inducción de un paso esencial en la diferenciación terminal de los tejidos (56, 45, 46, 13 y 62).

El tercer grupo de genes que influyen en el comportamiento neoplásico pueden ser denominados "moduladores", estos no transforman propiamente células normales en neoplásicas sino que modifican su expansión en el organismo. Por ejemplo la expansión metastásica puede estar influenciada por genes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (17, 43 y 64).

El grupo de genes sobre el que se ha trabajado más ampliamente es el de los Oncogenes, lograndose cada dia conocimientos y hallazgos muy importantes, tanto de estos como de sus productos protéicos, que permiten un mejor entendimiento de los mecanismos de transformación celular.

Se sabe que las células de mamífero contienen unos 50,000 genes, entre los que podemos incluir la familia de los Oncogenes y proto-oncogenes.

Los genes potenciales del cáncer son llamados proto-oncogenes y son genes normales que estan presentes en cada una de las células de un organismo, sujetos a un cuidadoso control debido a

que parecen ser críticos para la proliferación y diferenciación celular.

Los Oncogenes son versiones alteradas de estos genes que codifican para proteínas que desempeñan un papel importante en las células. De esta forma, los productos de oncogenes desarrollan funciones anormales y pueden provocar la transformación de una célula normal en cancerosa.

El estudio de los oncogenes comienza con el descubrimiento de genes de retrovirus capaces de provocar una transformación celular. El primer gene de origen retroviral con estas propiedades, fue aislado del virus que produce Sarcoma de Rouss en aves. A este gene se le conoce como src.

Poco tiempo después, se encontró, que existen homólogos de los oncogenes virales en células cancerosas, y que inclusive tales genes son capaces de transfectar, es decir, cuando se introducen a cultivos de células normales las transforman en cancerosas.

Los proto-oncogenes se encuentran altamente conservados en la escala filogenética, como es el caso de ras, que se encuentra en diversas especies que van desde las levaduras hasta el hombre; src se encuentra en invertebrados como Drosophyla y en muchos vertebrados. Esta constancia revela que los proto-oncogenes deben desempeñar funciones muy importantes en la célula.

Los mecanismos principales por los cuales un proto-oncogen se transforma en oncogen son los siguientes:

- 1) Mutaciones puntuales en algún o algunos nucleótidos.

2) Múltiples copias del gene (Amplificación).

3) Translocación del gene de un cromosoma a otro.

La forma en que repercuten tales alteraciones genéticas en sus productos protéicos es bien claro.

El estudio de la probable función de las proteínas codificadas por oncogenes comenzó en 1978 cuando se aisló la proteína p60src (producto del gene src con peso molecular de 60 kilodaltones) de células infectadas con el virus de Sarcoma de Rouss (12).

Se encontró que la proteína tenía actividad enzimática de cinasa, catalizando la transferencia del grupo fosfato terminal del ATP a otras proteínas. Sorprendentemente se encontró que tal fosforilación se efectuaba sobre el aminoácido tirosina y no sobre serina ni treonina como es lo común en la mayoría de las cinasas.

Existen razones para pensar que la fosforilación en tirosina puede ser uno de los mecanismos implicados en los complejos sistemas reguladores que controlan la forma y el crecimiento celular (40).

Actualmente se comienza a entender como funcionan las proteínas codificadas por algunos de los oncogenes, sugiriendo que dichas proteínas desarrollan un número limitado de funciones. Se puede mencionar que algunas de las proteínas codificadas por oncogenes, como es el caso de yes, fgr, abl, fps, fes y ros, tienen actividad cinasa específica para tirosinas, y además, a juzgar por sus secuencias de aminoácidos, existe una

estrecha homología entre las regiones catalíticas de este grupo de enzimas, ya que se han encontrado regiones similares aún en longitud.

Las proteínas blanco sobre las que actúan las tirosina-kinasas antes mencionadas son generalmente la vinculina y tres enzimas glucolíticas: la enolasa, la mutasa del fosfoglicerato y la lactato deshidrogenasa.

Algunas proteínas codificadas por oncogenes, parecen estar muy relacionadas con factores de crecimiento, como es el caso del producto del oncogene *sis*, que es el factor de crecimiento derivado de plaquetas conocido como PDGF, y como contraparte, el producto del oncogene *erb-B* es estructuralmente muy parecido al receptor del factor de crecimiento epidermal (EGF), principalmente el dominio interno de éste, el cual tiene actividad cinasa. Evidencias recientes sugieren que tal producto del oncogene, mimetiza de tal forma que el factor de crecimiento se une a él en gran cantidad y provoca el crecimiento desregulado de la célula (83, 21 y 22).

El producto de algunos oncogenes actúa en el núcleo celular, como es el caso de *myc*, *myb*, *fos*, *mil* y *ski*; oncogenes de esta familia que se expresan desreguladamente podrían alterar tal vez la transcripción de muchos genes necesarios tanto para un crecimiento y proliferación desregulados de las células cancerosas, como para que éstas lleven a cabo el proceso de metástasis.

Lo mencionado anteriormente podría explicar el elevado número de alteraciones que presentan las células tumorales.

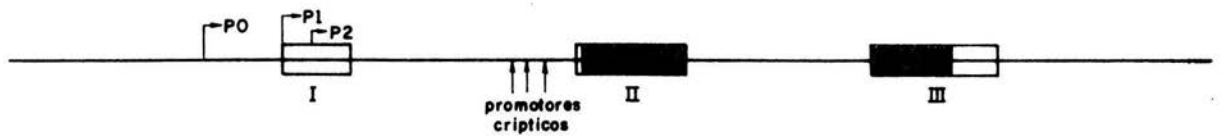
Particularmente en el caso del oncogene myc, se piensa que una producción desregulada de la proteína codificada por este gene, hace de la replicación del ADN celular un proceso continuo en células transformadas.

EL GENE c-myc Y SU PRODUCTO

El proto-oncogene c-myc (Fig. 1) ha sido el foco de numerosos estudios que han permitido el entendimiento de muchos de los mecanismos principales por medio de los cuales los genes celulares normales pueden ser activados en células tumorales, incluyendo la inserción proviral, la amplificación génica y la translocación cromosómica. La expresión del gene c-myc esta fuertemente relacionada con la acción de factores de crecimiento y con la entrada de las células al ciclo celular, lo que sugiere que la expresión del gene c-myc puede ser un componente importante en las redes regulatorias asociadas con la proliferación celular normal.

El gene c-myc fue primero identificado como la secuencia transformante del retrovirus de aves MC29, y como muchos otros proto-oncogenes, se encontró una elevada conservación evolutiva de éste (78). Estudios tempranos de clonación permitieron identificar dos exones del gene celular en aves y mamíferos, que fueron homólogos a las secuencias virales.

Fig.1.- El gene c-myc. Exones (I, II y III), Promotores (P0, P1 y P2) y promotores crípticos (Flechas cerca del exon II).



c - myc humano

1 Kb

Sin embargo, el subsecuente análisis de la secuencia del ADNc de c-myc murino y de clonas genómicas humanas (67, 3 y 6), permitieron identificar una de las características más sorprendentes del gene, que fué la existencia de un largo primer exon con una longitud de 400-500 pares de bases que no es traducido ya que carece de codones de iniciación, pero que contiene codones de terminación en todos los marcos de lectura. La secuencia de nucleótidos del primer exon esta conservada en un 70 % entre el ratón y el hombre, mientras que los exones que codifican mantienen una homología mayor al 90 %, aunque la homología del primer exon no se conserva de la misma forma entre aves y mamíferos (6 y 51). Otra característica poco común que se presenta en este gene es al nivel del promotor, ya que existen en el dos distintos sitios de iniciación de la transcripción, conteniendo secuencias TATAA separadas por 160 pares de bases, designadas P1 y P2 (3 y 6). La conservación de estas características entre genes de aves y mamíferos, ha sugerido algunos modelos que proponen un papel regulatorio muy importante para el no traducido primer exon de c-myc.

El gene c-myc esta altamente conservado entre los diversos cordados, ya que se ha encontrado en genomas de humano, de roedores, de aves e inclusive de peces, presentando homologías entre ellos que van desde un 62 a un 90 % (6, 80 y 76). Sorprendentemente, no se ha encontrado actualmente un gene homólogo a c-myc en organismos invertebrados.

Muchos genes celulares pertenecen a familias de genes relacionados que codifican para secuencias de aminoácidos conservadas que forman dominios que se piensa tienen funciones similares dentro de la célula, por lo que se piensa que estas familias de genes son derivadas de un gene ancestral común. Entre los proto-oncogenes el mejor ejemplo de esta interrelación es la familia tirosina-cinasa, en la cual cada gene encuadra un pequeño dominio proteico asociado con la actividad cinasa (14). De manera similar, los estudios de células tumorales y del ADN de mamíferos han permitido identificar una pequeña familia de genes relacionados con c-myc.

El primer gene relacionado con c-myc identificado fue descubierto en neuroblastomas, encontrándose homologías en varias regiones del gene, primeramente en dos pequeños dominios de 70 y 80 pares de bases separadas por 120-150 pares de bases, localizadas en la parte media del segundo exon de c-myc, y más tarde, se detectaron homologías más grandes, aunque más dispersas, en otras regiones del gene. Este gene fue llamado N-myc, y presenta además la misma característica que c-myc con respecto a tener un primer exon no traducido, lo que apoya la idea de la participación de éste en la regulación del gene (19, 47, 54 y 68).

Estudios posteriores han permitido identificar otros genes relacionados, principalmente por su homología en las secuencias antes mencionadas dentro del segundo exon.

En ADN de humano se han detectado cuatro locus de la familia myc, c-, N-, L- y U-; mientras que en ADN de ratón se encontró uno más, B-myc, el cual tiene una homología mucho mayor con la región que codifica en c-myc, aunque no parece encontrarse en el genoma humano (87 y 42).

El oncogene c-myc esta implicado en el desarrollo neoplásico en diferentes sistemas biológicos. Algunos estudios sobre linfomas de células B de pollo inducidos por el virus de leucosis en aves, demuestran que el ADN del provirus puede integrarse cerca de c-myc y causar una sobre expresión de este gene (38 y 58).

En algunos linfomas de Burkitt humanos y en leucemias leucocíticas agudas, c-myc esta translocado del cromosoma 8 a alguno de los locis de inmunoglobulinas localizados sobre los cromosomas 14, 2 o 22.

En muchos casos, como ya se ha mencionado, el gene c-myc se encuentra amplificado, y generalmente se encuentra una fuerte correlación entre alguna alteración del gene y la transformación neoplásica. Sin embargo, aún no se conoce si la actividad oncogénica asociada con c-myc es resultado de su elevado nivel de expresión (53, 57 y 71), o de las alteraciones cualitativas de su producto (60) o a la pérdida de su expresión regulada (15 y 63), o bien a los tres en su conjunto.

Se han hecho estudios sobre el producto del gene v-myc, encontrandose que se trata de una poliproteína de fusión

retroviral de un peso molecular de 110,000 daltones con localización nuclear y que se enlaza al ADN (1, 2, 20, 36 y 55).

En general la caracterización detallada de los productos protéicos de los oncogenes representa una tarea problemática debido a su limitada viabilidad y a su relativamente bajo nivel de síntesis tanto en células normales como en transformadas.

Sin embargo, por medio de técnicas de clonación molecular se han comenzado a obtener avances importantes en el estudio de los productos de oncogenes, tal es el caso del oncogene c-myc, clonado y sobre expresado en Escherichia coli.

La proteína c-myc tiene características poco usuales que comparte con algunos productos de otros oncogenes como es el caso de c-fos (16) y la proteína E1A de Adenovirus (27). Las tres proteínas están fosforiladas, tienen un alto contenido de prolina y su localización es mayoritariamente nuclear (1 y 20). Otra característica que comparten es su corrimiento anómalo en Electroforesis en Gel de Poliacrilamida-SDS con pesos moleculares aparentes mucho mayores a los predichos por sus secuencias. La proteína c-myc tiene un peso molecular, deducido de su secuencia, de 48,000 daltones (11 y 76), migrando como un doblete con peso molecular aparente de 62,000 y 64,000 o de 64,000 y 67,000 daltones (2 y 37), aún en el producto del gene expresado en E. coli.

Sin embargo, algunos investigadores han reportado pesos moleculares para la proteína c-myc que están en el rango entre

el peso deducido y el de los dobletes observados por otros (34).

Existe aún muy poca información sobre la naturaleza precisa de las modificaciones posttraduccionales de la proteína, aunque se sabe que la fosforilación de ésta es sobre serina y treonina y no sobre residuos de tirosina.

La proteína c-myc tiene una vida media muy corta (20-30 minutos) (37), lo cual es apropiado para un gene con un potencial papel en la regulación de la proliferación celular.

El producto del gene c-myc aislado por diferentes metodologías se ha demostrado que se enlaza a ADN de doble cadena inespecíficamente con una afinidad muy elevada a pH neutro y a moderadas concentraciones de sales (20, 37 y 81). Interesantemente la proteína c-myc aparentemente se disocia de los cromosomas condensados durante la metafase (85), sugiriendo que no está permanentemente asociada al ADN.

La característica de alta pero inespecífica afinidad por ADN de doble cadena, parece ser una propiedad característica de proteínas con función regulatoria que se unen a ADN de eucariontes, y distintiva de aquellas de procariontes.

Algunos estudios sugieren que la proteína se enlaza a la fracción 1 de la matriz nuclear mediante una interacción metal-específica dependiente de Cu^{++} (77 y 25), lo que resulta interesante debido a que la mayoría de las proteínas de la matriz nuclear que tienen esta interacción, se han observado

implicadas en la Replicación del ADN, en la Transcripción de ARN y en el Procesamiento del mismo.

Es necesario integrar todos estos recientes hallazgos para iniciar estudios sobre el posible papel funcional del producto del gene c-myc. Recientemente se han presentado evidencias que llevan a sugerir que una de las funciones del producto de c-myc es el promover la Replicación del ADN celular por medio de su unión a sitios de iniciación de la replicación (41), es decir, que la proteína c-myc tiene afinidad específica por algunas regiones del ADN.

Sin embargo, las observaciones anteriores no han sido concluyentes, ya que dilucidar el papel funcional de la proteína en la cromatina celular es sumamente difícil dada la complejidad de ésta, por lo que se ha tenido que recurrir a sistemas modelo que simplifiquen el entendimiento de los procesos de Replicación y Transcripción celular.

En el presente trabajo hemos elegido como sistema modelo el virus de simio clasificado con el número 40 (SV40) por su simplicidad y por poseer características similares a la cromatina celular.

EL VIRUS SV-40

Este virus fue detectado primeramente en 1960 (69), como contaminante de vacunas contra la poliomielitis producidas en

riñón de mono. Posteriormente a su descubrimiento, se demostró que este virus es capaz de producir tumores cuando se inyecta a Hamsters recién nacidos (74).

SV-40 pertenece a la familia de los Papovavirus y se encuentra entre los más pequeños. Originalmente se le conoció como agente vacuolizante debido a su capacidad para producir múltiples vacuolas en el citoplasma de células de Riñón de Mono Verde Africano.

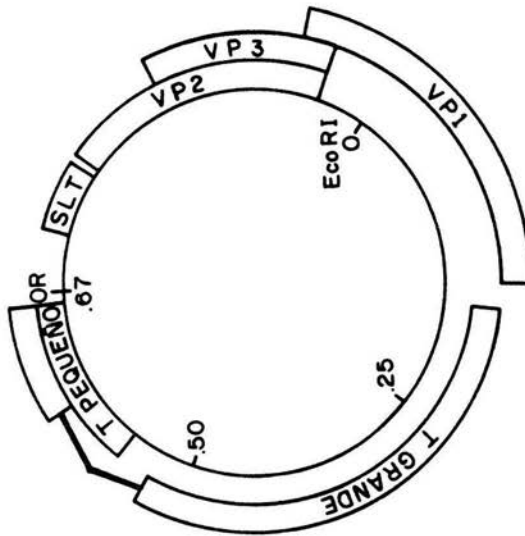
Los viriones son casi esféricos y se encuentran formados por ADN y Proteína. El diámetro de cada virión es de 45nm. La Cápside es Icosahédrica y se encuentra formada por 72 capsómeros.

Los componentes protéicos estructurales del virus lo constituyen las denominadas Vp1, Vp2 y Vp3, con pesos moleculares de 45,000, 42,000 y 30,000 daltones respectivamente.

El genoma de SV40 (Fig. 2) está constituido por 5243 pares de bases arregladas en una doble cadena circular covalentemente cerrada, con un peso molecular de 3.6×10^6 daltones (59). El pequeño tamaño de éste, ha permitido la construcción de un mapa físico detallado y el conocimiento de la secuencia completa del ADN. (29)

Durante la infección en células permisivas, el ADN de SV40 se halla en una estructura similar a la de la cromatina celular, es decir, se encuentra asociado a histonas de origen celular formando nucleosomas, por lo que se le considera un minicromosoma. Observaciones de minicromosomas de SV-40 al

Fig.2.- El genoma del virus SV-40. Origen de Replicación (ori).



microscopio electrónico, han mostrado que el genoma viral se empaqueta en 24 nucleosomas.

Además de las histonas, SV40 utiliza la maquinaria celular para la replicación y expresión de su material genético.

El ADN del virus, puede ser dividido en términos biológicos en dos regiones, la temprana y la tardía, que se expresan secuencialmente durante el ciclo lítico de infección en células permisivas. La región temprana que se expresa al inicio de la infección codifica dos genes que son transcritos a ARNm en ausencia de cualquier proteína viral funcional. Los productos de estos genes son el antígeno T grande (Ag T) de 90 Kd y el antígeno t pequeño (Ag t) de 20 Kd. El Ag T es la única proteína viral necesaria para la replicación del ADN viral (72), mientras que la función del Ag t no ha sido aún bien definida.

El momento en el cual la síntesis de ADN viral empieza, define el final de la fase temprana y el inicio de la fase tardía durante la cual se expresa la región tardía de ADN que tiene como resultado la síntesis de ARNm para las proteínas de la cápside Vp1, Vp2 y Vp3.

REPLICACION DEL VIRUS

La Replicación del virus procede por un mecanismo semiconservativo y bidireccional dando lugar a intermediarios replicativos. El origen de Replicación ha sido mapeado en una

región de 60-65 pares de bases , concentrándose en el único sitio de reconocimiento para la enzima Bgl I.

La iniciación de cada vuelta de replicación del ADN viral requiere de concentraciones adecuadas de Ag T como ha sido demostrado trabajando con mutantes temperatura sensibles (66). Tetrámeros de Ag T reconocen y se unen cooperativamente a una familia de secuencias que definen tres regiones. La región I, cae dentro del lado temprano del origen, la región II dentro del origen de replicación y la región III se halla en la región tardía del ADN viral (50).

Además de las secuencias de origen y del Ag T, el virus requiere para su replicación de proteínas específicas de la célula huésped. Entre las proteínas celulares que se han observado participan en la replicación del ADN viral están la Alfa-ADN polimerasa, encargada de la síntesis del ADN de SV-40 y proteínas desestabilizadoras de hélice como las topoisomerasas, primasas y ligasas (48).

El porcentaje de moléculas activas en replicación solo representa un 5 % de la totalidad de los minicromosomas (7).

A medida que se efectúa la replicación, se lleva a cabo el desenrollamiento del ADN de los nucleosomas que se encuentran frente al tenedor de replicación y el enrollamiento del ADN nuevo una vez que el tenedor de replicación ha pasado (70).

Dado que la replicación en este sistema es semidiscontinua, existen evidencias que sugieren que los octámeros de Histonas "viejas" se asocian con el brazo que se sintetiza de manera

continúa, mientras que los octámeros recién sintetizados se asocian al brazo que se sintetiza en fragmentos de Okazaki (18).

TRANSCRIPCIÓN DE SV-40

La síntesis de los transcritos de SV-40 se lleva a cabo gracias a la acción de la ARN polimerasa II de la célula huésped, y muy probablemente por factores celulares necesarios para la iniciación (31).

Existen dos tipos de ARNm tempranos que codifican el Ag T grande y el Ag t pequeño, respectivamente. Ambas clases de mensajeros, usan el mismo conjunto de secuencias 5'-3' terminales y son transcritos de la misma región promotora (26).

El extremo 5' de los ARNm virales mapean en sitios cercanos al origen de replicación. Aproximadamente de 25 a 30 nucleótidos del inicio se encuentra una secuencia que asemeja la caja "TATA", localizada en el extremo 5' de la mayoría de los genes eucariontes. Cuando se elimina la caja "TATA", no hay bloqueo de la transcripción "in vivo" o "in vitro", pero el sitio de iniciación se distribuye a través de una amplia región de ADN. Las secuencias estrictamente necesarias para la transcripción "in vivo" se encuentran por arriba de la caja "TATA". Estas secuencias las constituyen tres regiones repetidas de 21 pb y dos copias de 72 pb (5).

La eliminación de una de las regiones de 72 pb da lugar a mutantes viables de SV-40, pero si se eliminan las dos copias,

los mutantes no son viables y el daño causado a la región temprana es sumamente drástico. Este daño puede ser reparado si se inserta una secuencia de 72 pb ya sea en el mismo sitio o incluso a una distancia de 4,000 pb de la región que se expresa tempranamente independientemente de la orientación. Las secuencias repetidas de 72 pb son también capaces de estimular la expresión de genes diferentes a los de SV-40, por lo que se les ha considerado como estimuladores de la transcripción o "enhancers" (4).

Normalmente la expresión de los ARNm tempranos es retroregulada por uno de los productos sintetizados durante su expresión, el Ag T, el que al unirse a las regiones I, II y III ya descritas, bloquea el paso de la ARN polimerasa II hacia la región temprana, obligandola a recorrer la región tardía (61).

El porcentaje de moléculas activas en transcripción representa solo el 1 % del total de minicromosomas (32).

El inicio de la producción de los mensajeros tardíos y su regulación parece más complejo que el de los ARNm tempranos, ya que estos mensajeros tardíos presentan extremos 5' heterogéneos (26).

OBJETIVOS

1.- Detectar proteínas antigenicamente relacionadas con el producto del Oncogene c-myc, mediante la metodología de electrotransferencia e inmunodetección.

2.- Analizar la posible implicación de la proteína c-myc en replicación y/o transcripción.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para cubrir los objetivos de este trabajo, nos propusimos llevar a cabo la siguiente estrategia experimental:

Como primera fase, evidenciar la presencia de la proteína c-myc o de proteínas antigenicamente relacionadas a ésta, en las líneas celulares HeLa y CV-1 mediante corrimientos electroforéticos de lisados celulares totales en gel de poliacrilamida-SDS, su electrotransferencia a filtros de nitrocelulosa y su inmunodetección con anticuerpos monoclonales dirigidos contra los aminoácidos 43-55 y 171-188 de la proteína deducida a partir de la secuencia de nucleótidos del gene.

Posteriormente, realizar la propagación del virus SV-40 para después utilizarlo para infectar cultivos celulares de la

línea CV-1, hacer la extracción de los minicromosomas de SV-40 por la metodología descrita por Varshavsky, tratandolos después con ARNasa A o precipitando los complejos replicativos con la proteína p-32 y anticuerpos dirigidos contra ella, y tratar de detectar en todos estos sistemas la presencia del producto del oncogene c-myc o de proteínas antigenicamente relacionadas a el para analizar su participación en transcripción o replicación en los minicromosomas de SV-40.

MATERIAL Y METODOS

LINEAS CELULARES.

Se emplearon dos líneas celulares:

HeLa (línea establecida a partir de células de tumor cervicouterino), que se cultivó en monocapa en Medio Mínimo Escencial (MEM) suplementado con 10% de suero fetal de Ternera.

CV1 (línea celular establecida a partir de células de riñón de mono), que se cultivó en monocapa en Medio Eagle modificado por Dulbecco, suplementado con 7% de suero fetal de Ternera.

1.- Descongelamiento de líneas celulares

Un vial de plástico conteniendo 1×10^6 células mantenido en congelación en nitrógeno líquido, se sacó del termo y se mantuvo por 30 segundos en un baño de agua a 50° C para permitir que se descongelaran la mayoría de las células. Cuando quedó en el fondo del vial todavía una pastilla de material congelado, todo el contenido del vial se pasó inmediatamente en condiciones de estricta esterilidad (campana de flujo laminar) a una caja de cultivo p-100, a la cual previamente se le colocaron 10 ml de medio con suero fetal de ternera a la concentración requerida para la línea celular.

Se incubó a 37° C con atmosfera de CO_2 a un 6% por 3 horas para permitir que las células se adhirieran a la caja.

Se retiró el medio con la ayuda de una pipeta pasteur y se añadieron 10 ml de medio fresco completo.

Este paso se llevo a cabo para eliminar el dimetil sulfoxido que tiene el medio en el que estan las células congeladas.

Se mantuvo la caja a 37° C en ambiente de CO₂ al 6% por varios dias para permitir el crecimiento celular.

2.- Pasaje de líneas celulares

Se eliminó el medio de las cajas de cultivo y se lavó la monocapa dos veces con 5 ml de PBS (NaCl 137mM, KCl 3mM, Na₂HPO₄ 2 mM, KH₂PO₄ 2mM) cada una.

Se añadieron 7 ml de Tripsina (Tripsina 0.05%, NaCl 0.8%, KCl 0.04%, Dextrosa 0.1%, NaHCO₃ 0.058%, EDTA 0.02%) y se incubó a 37° C por 5 minutos.

Se sacaron las cajas de la incubadora y se golpearon un poco para desprender las células.

Las células se colocaron en un tubo falcon que contenía 1 ml de suero fetal, enjuagandose finalmente las cajas con 2 ml de tripsina, vertiendo el contenido en el tubo falcon.

Se centrifugó por 5 minutos a 3000 rpm para empastillar las células y se desechó el sobrenadante.

La pastilla se resuspendió en 5 ml de medio con suero fetal de ternera al porcentaje requerido por la línea celular, por cada caja tripsinizada, y antibióticos (Penicilina 50 unidades por ml y Estreptomycin 100 ug por ml).

A las cajas limpias se les colocaron 10 ml de medio complementado con suero y antibióticos y se sembraron las células a una densidad de 3 a 4 x 10⁶ por caja p-100.

Las cajas sembradas se mantuvieron en la incubadora a 37° C con 6% de CO₂ durante tres o cuatro días hasta que la monocapa alcanzó la confluencia, pudiendo después de esto ser utilizadas para algún experimento o bien continuar con los pasajes de mantenimiento.

3.- Análisis de los lotes de virus SV-40 del laboratorio por microscopía electrónica.

Los lotes de virus SV-40 ya existentes en el laboratorio, se diluyeron 1:10 con agua bidestilada estéril.

Se siguió la técnica de tinción negativa de la siguiente forma:

Se colocaron 10 ul de cada muestra sobre rejillas de Cobre de 200 mesh durante 2 minutos para permitir la adherencia de la muestra. Posteriormente se eliminó la muestra no adherida añadiendo una gota de Acetato de Uranilo al 2% (colorante) permitiendo el contacto con éste por 2 minutos. Se eliminó el exceso de colorante volteando la rejilla y secando con papel filtro Whattman 1mm haciendo líneas de secado sobre la rejilla. Se colocaron las rejillas sobre una caja Petri de manera ordenada para observarlas al microscopio electrónico algunas horas más tarde. Esta metodología permite observar en

cada lote los porcentajes de virus incompletos (cápsides vacías) y de virus completos potencialmente infectivos.

Se seleccionó un lote de virus SV-40 para realizar su propagación.

4.- Propagación del virus SV-40

Se sembraron 20 cajas p-100 con 3×10^6 células de la línea celular CV1 por caja y se incubaron por 24 horas a 37°C con 6% de CO_2 para que alcanzaran la fase logarítmica de crecimiento. Se retiró el medio de las cajas y se lavaron las monocapas dos veces con PBS estéril; posteriormente se realizó la infección con el lote de virus SV-40 a una moi de 0.01 ufp/cel., haciendo la dilución del virus en 500 ul de medio por cada caja de células, vertiendolo a las cajas y oscilandolas para lograr una distribución homogénea. Se incubaron las cajas a 37°C en ambiente de CO_2 al 6% por 90 minutos con oscilaciones cada 20 minutos, para permitir la adsorción del virus. Una vez transcurrido ese tiempo, se detuvo la infección añadiendo a cada caja 10 ml de medio con suero fetal de Ternera al 2%, y se mantuvieron en la incubadora a 37°C con 6% de CO_2 durante 12 días, tiempo en el cual se pudo observar el efecto citopático.

Tratando de realizar los pasos siguientes en las mayores condiciones de esterilidad, y trabajando en la campana de flujo laminar, se rasparon las cajas con la ayuda de un fragmento de hule estéril, sin retirar el medio, vertiendose el contenido

de las cajas a dos botellas de 150 ml limpias y estériles. Posteriormente se centrifugó el contenido a 8000 rpm por 30 minutos en un rotor GSA Sorvall a 4° C.

El sobrenadante de esta centrifugación conteniendo la mayoría del virus, se guardó en tubos estériles en refrigeración, y el precipitado se resuspendió en 15 ml de PBS por cada 10 cajas de células, realizando tres ciclos de congelación-descongelación en una mezcla de acetona-hielo seco para congelar rápidamente y en un baño a 37° C para descongelar. Este procedimiento permite lisar las células y liberar el virus que se encuentre en su interior. La pastilla resuspendida se centrifugó nuevamente a 8000 rpm por 30 minutos en un rotor SS34 Sorvall a 4° C. El precipitado se desechó, y el sobrenadante obtenido se juntó con el que se había guardado de la anterior centrifugación, vaciándolo a tubos de polialómero, y centrifugándolo a 25,000 rpm por 5 horas a 4° C en un rotor Beckman SW 28. El sobrenadante se descartó, y las pastillas que contenían el virus fueron resuspendidas en medio con suero al 1%, juntando el contenido de los tubos en uno solo y dejando en incubación por 18 horas a 4° C. Posteriormente el contenido del tubo se resuspendió suavemente con pipeta Pasteur y se centrifugó a 2,000 rpm por 10 minutos a 4° C con la finalidad de eliminar los agregados. Se hicieron alicuotas de 1 ml del sobrenadante, y se almacenaron en criotubos a -20° C.

Se tomó una alícuota de 10 μ l de uno de los tubos para su observación al microscopio electrónico. La concentración del virus en la suspensión se determinó por dos métodos, extrayendo el ADN viral por el método de Hirt (39) y cuantificándolo por el método de Burton (9), y titulándolo por Unidades Formadoras de Placas (ufp).

5.- Extracción de ADN viral por el Método de Hirt (39).

Se crecieron 5 cajas p-60 de células CV1 durante 48 horas, permitiendo que la monocapa llegara a semiconfluencia y se realizó la infección con diferentes diluciones del lote de virus propagado, en 500 μ l de medio sin suero a cada caja de células. Se permitió la adsorción del virus por 90 minutos y se paró la infección añadiendo a cada caja 5 ml de medio con 2% de suero. A las 24 hrs. postinfección se realizó un marcaje añadiendo a cada caja 25 μ l de ^3H -Timidina (1.25 $\mu\text{Ci}/\text{caja}$) para posteriormente, realizar la extracción de ADN. 40 hrs. postinfección, se retiró el medio y se lavaron las monocapas dos veces con 2.5 ml de PBS estéril, añadiendo después a cada caja 1.0 ml de solución de Hirt (Tris-HCl 10 mM pH 7.9, EDTA 10 mM y SDS 0.6%). Se mantuvieron de 10 a 20 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación de un gel debido a la lisis celular por efecto de la solución, y se vació el contenido de cada caja inclinándola y ayudándose raspando suavemente con un fragmento de hule, a tubos de microfuga de 1.5 ml. Posteriormente se agregó a cada tubo 250

ul de una solución de NaCl 5M para tener una concentración final 1 M de sal, se cerraron los tubos y se mezcló cada uno 5 veces lentamente por inversion, incubandose posteriormente durante 18 hrs a 4° C. Se centrifugaron los tubos en la microfuga durante 30 minutos a 10,000 rpm a 4° C, colectandose la mayor cantidad de sobrenadante posible y pasandolo a tubos más grandes.

Se añadió a cada tubo, medio volúmen de Fenol y medio volúmen de Cloroformo Isoamílico, se taparon los tubos mezclando bien el contenido y se centrifugaron a 3,000 rpm por 10 minutos a 4° C.

Se recuperó la fase acuosa pasandola a otro tubo. Se le añadieron 5 ml (2 vol.) de alcohol etílico a cada tubo y se dejo precipitando a -20° C por 18-24 horas; transcurrido este tiempo, se centrifugaron los tubos a 8,000 rpm por 30 minutos en un rotor Sorvall SS34 a 4° C. Se decantó cuidadosamente el etanol y se añadieron 5 ml de etanol al 80 %, mezclandose bien y reempastillandose centrifugando 2 minutos a 3,000 rpm. Se decantó el etanol y se escurrieron los tubos cuidadosamente, metiendolos posteriormente durante 5 minutos a un desecador en posición vertical. Se resuspendió cada pastilla en 250ul de TE (Tris-HCl 10mM pH 7.4, EDTA 1mM) colocandose 15ul de cada fracción en papel DE 81 (DEAE celulosa), dejando secar y precipitando de 3 a 5 veces durante 5 minutos cada una, con TCA al 5% y dos veces con etanol absoluto al 95 % para después de dejar secar, cuantificar la radiactividad incorporada en un

Contador de Centelleo. Se preparó un gel de Agarosa al 1% en TE para realizar una observación cualitativa del ADN viral, tomándose 20ul de cada muestra, mezclándose con 3ul de ABF (Glicerol 50%, EDTA 1mM, Azul de Bromofenol 0.4%, Xilencianol 0.4%) y metiéndose a diferentes pozos del gel. Se corrió el gel a 55 volts por 6 horas y se visualizó el ADN colocando el gel en una pantalla con luz ultravioleta. Posteriormente se cuantificó el ADN por el método de Burton.

6.- Cuantificación de ADN por el método de Burton (9).

Se preparó una solución de ADN de Timo de Ternera de 0.4 mg/ml en 5mM NaOH. De esta solución se hicieron diluciones para construir una Curva Patrón. Se mezcló un volumen igual de solución stock con HClO₄ 1N y se calentó a 70° C por 15 minutos. Estas soluciones se prepararon a una concentración de 10, 20, 30 y 40 ug/ml y para el ensayo, estas correspondieron a 2, 4, 6 y 8 ug/ml respectivamente. El reactivo de Difenilamina se preparó disolviendo 1.5 gr de ésta en 100 ml de Acido Acético adicionando 1.5 ml de Acido Sulfurico, almacenándose en oscuridad hasta su uso. En el momento del ensayo, se tomó 0.1 ml de Acetaldehido Acuoso (16 mg/ml) y se adicionó por cada 20 ml de Reactivo de Difenilamina.

Para el ensayo se tomaron 200ul de la muestra, se le adicionaron 200ul de HClO₄ 0.5 N y 800ul del reactivo de Difenilamina-Acetaldehido.

Los tubos conteniendo la muestra se mantuvieron en la oscuridad y en agitación suave por un periodo de 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se determinó la Absorbancia a 600 nm en un Espectrofotometro Beckman. De la cantidad de ADN determinada por este método y de las cuentas por minuto totales se determinó la actividad específica (cpm/ug de ADN).

7.- Titulación del virus SV-40 por ufp.

Se sembraron 20 cajas P-60 con 1×10^6 células de la línea CV-1 por caja y se incubaron por 24 horas a 37°C en ambiente de CO_2 al 6%. Se eliminó el medio y se lavaron las monocapas 2 veces con PBS estéril (suavemente).

Se hicieron diluciones del virus en medio sin suero, desde $1:1 \times 10^6$ hasta $1:1 \times 10^9$, y se infectaron las monocapas con 0.2 ml de cada dilución (4 cajas por dilución), permitiendo la adsorción del virus por 90 minutos con oscilaciones cada 20 minutos. Se preparó una mezcla de agar 1.8% (agar noble especial) y Medio Dulbecco con 5 % de Suero Fetal de Ternera, para dar una concentración final de agar 0.9 %, y se mantuvo a 45°C hasta su uso. Se añadieron 5 ml de la mezcla de agar a cada caja, y una vez solidificado, se incubaron a 37°C en ambiente de CO_2 al 6 % invertidas durante aproximadamente dos semanas. Las placas comenzaron a observarse entre los 14 y los 18 días, y se tiñeron con una solución de Rojo Neutro estéril a una concentración final de 0.01 % en Medio Dulbecco

sin suero, añadiendo 4 ml por caja e incubandolas a 37° C por 18 horas. Una vez transcurrido ese tiempo, se retiró el colorante y se observaron las placas para contarlas.

El título viral se obtuvo multiplicando el numero de placas de cada caja, por la correspondiente dilución del virus con el que se infectó, considerando en el valor final que se utilizó únicamente un volúmen de 0.2 ml de la dilución en la infección.

8.-Extracción de Complejos Nucleoproteicos de SV-40.

A) Infección de celulas CV-1.

La infección se realizó de manera similar a la descrita para la propagación del virus, con la variación de que se utilizaron 10 ufp/cel. Se incubó durante 90 minutos para permitir la adsorción viral y se paró la infección añadiendo a cada caja 10 ml de Medio suplementado con 2% de Suero Fetal de Ternera, considerandose este momento como el tiempo cero de la infección.

B) Marcaje de celulas CV-1.

Se emplearon dos tipos de marcaje, de acuerdo a las necesidades de los experimentos:

Marcaje largo.- 24 horas postinfección, se marcaron las células añadiendo a cada caja P-100, sin retirar el medio, 2.5 uCi de ¹⁴C-Timidina o bien, 25 uCi de ³H-Timidina.

Pulso.- 40 horas postinfección, se marcaron las células con un pulso de 5 minutos con ³H-Timidina. Previamente al

pulso, las monocapas de células se lavaron dos veces con 2.5 ml de Medio precalentado suplementado con 2% de Suero Fetal de Ternera, adicionandose finalmente 2.0 ml de este medio y 100 uCi/ml de ^3H -Timidina, incubandose por 5 minutos a 37°C . El marcaje se paró colocando las cajas en hielo, retirando rapidamente el medio y adicionando 2.5 ml de Amortiguador 1 (Tris-HCl 1mM pH 6.8, NaCl 140mM) frio. Se utilizaron simultaneamente ambos marcajes en algunos experimentos (largo con ^{14}C -Timidina y corto con ^3H -Timidina), para tener un marcaje diferencial de Complejos Replicativos y Complejos Maduros.

Se procedió inmediatamente a la extracción de complejos nucleoprotéicos.

El método empleado para la extracción de los minicromosomas fué el descrito por Varshavsky, A. (79), que emplea una concentración de NaCl de 0.14M.

Se retiró el medio de las cajas de células, 40 horas postinfección, se lavaron dos veces con 2.5 ml del Amortiguador 1 y posteriormente se añadió a cada caja 2.0 ml del Amortiguador 2 (TEA-HCl 10 mM pH 6.8, Triton X-100 0.25 %, EDTA-Na 10 mM, PMSF 1 mM) adicionando NaCl a una concentración final de 120 mM, e incubando las cajas durante 10 minutos a 4°C sobre hielo en posición perfectamente horizontal. El lisado obtenido se raspó de las cajas con la ayuda de un fragmento de hule, se vació a un tubo y se centrifugó durante 5 minutos a 6,500 rpm en un rotor Sorvall SS34 a 4°C . La pastilla obtenida se resuspendió en el volumen adecuado de

Amortiguador 3 (TEA-HCl 10 mM pH 6.8, Triton X-100 0.25 %, NaCl 120 mM, EDTA 10 mM, PMSF 0.1 mM) en una proporción de 2.0 ml por cada caja P-100 de Células o por cada 1×10^6 células y se centrifugó nuevamente por 5 minutos a las mismas condiciones que la anterior centrifugación.

La pastilla obtenida se resuspendió añadiendo gota a gota 100 ul del Amortiguador 4 (TEA-HCl 10 mM pH 8.0, Triton X-100 0.25 %, NaCl 120 mM, EDTA 10 mM, PMSF 0.1 mM) por cada caja de células, golpeando ligeramente el tubo para homogenizar, incubándose en agitación suave a 4° C por 3 horas para permitir que el material viral se separe de la cromatina celular.

Posteriormente se centrifugó durante 15 minutos bajo las condiciones ya mencionadas, recuperando el sobrenadante, guardando 15 ul de éste para cuantificar radioactividad total incorporada y colocando el resto poco a poco sobre un gradiente lineal de sacarosa del 5 al 25 %, con un colchón de sacarosa al 40 % en Amortiguador 5 (TEA-HCl 10 mM pH 7.5, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM). Se centrifugó durante 53 minutos en un rotor Beckman SW-50.1 a 45,000 rpm a 4° C para permitir la sedimentación de los minicromosomas en el gradiente; una vez habiéndose detenido la ultracentrifuga, se sacaron los tubos y se colectaron entre 20 y 22 fracciones de aproximadamente 250 ul con un colector Gilson minipulsos 2 a 600, cambiando de fracción cada 15 segundos y marcando las fracciones con

numeración progresiva. Para evidenciar el perfil de sedimentación de los minicromosomas, se tomaron 15 ul de cada fracción, y los 15 ul almacenados antes de la sedimentación en el gradiente, colocándose sobre fragmentos de papel Whatman 3 MM de 2 x 2 cm con su numeración correspondiente, se dejaron secar en estufa a 32° C y se precipitó la muestra de tres a cinco veces por periodos de 5 minutos con TCA al 5 % y dos veces más con etanol absoluto al 95 %.

Se extendieron los papeles dejándose secar nuevamente, colocándose cada papel en un vial conteniendo 5 ml de una solución de centelleo constituido por PPO 1.25 % y POPOP 0.04 % en Tolueno, y se contó la radiactividad incorporada por espacio de un minuto, en un Contador de Centelleo Líquido modelo C2425 Packard, bajo condiciones automáticas de ^3H , ^{14}C , y $^3\text{H}/^{14}\text{C}$, obteniéndose así el Perfil de Sedimentación de los Minicromosomas en el gradiente de Sacarosa.

9.- Cuantificación de Cromatina de SV-40 por el Método de Agarosa en Placas (52).

Esta metodología se utilizó debido a que es bastante rápida y permite detectar de forma semicuantitativa cantidades de ADN que no pueden ser cuantificadas espectrofotométricamente.

Se tomaron 10 ul de cada fracción del perfil de sedimentación del gradiente de sacarosa y se colocaron sobre una superficie de agarosa al 1 % conteniendo 0.5 ug/ml de

bromuro de etidio, solidificada en una caja petri. Se colocaron en la misma placa concentraciones conocidas de ADN para tenerlas de referencia. Se permitió la difusión del material y se observó la placa en un transiluminador de luz Ultravioleta de onda corta.

10.- Tratamiento de Complejos Nucleoprotéicos de SV-40 con ARNasa A.

Posterior a la incubación en agitación de los complejos por 3 horas a 4° C, se realizó una centrifugación por 15 minutos a 6,500 rpm a 4° C en un rotor Sorvall SS34, y el sobrenadante obtenido se dividió en 2 fracciones del mismo volúmen, añadiéndose a una de ellas ARNasa A a una concentración final de 4 ug/ml, e incubándose ambas fracciones durante 30 minutos a 4° C para permitir la acción de la ARNasa A. Inmediatamente después de transcurrido este tiempo, ambas fracciones se colocaron sobre gradientes lineales de sacarosa del 5 al 25 %, y se sometieron a centrifugación a 45,000 rpm durante 53 minutos a 4° C en un rotor Beckman SW 50.1. Se colectaron fracciones de ambos tubos de la misma forma descrita anteriormente, tomándose 15 ul de cada una para contar radiactividad incorporada.

11.- Obtención de Complejos Nucleoproteicos de SV-40 Activos en Replicación.

Se crecieron varias cajas de células CV-1 y se infectaron con el stock de virus propagado. Se realizó un marcaje 24 horas postinfección con ^{14}C -Timidina y un pulso de 5 minutos 40 horas postinfección con ^3H -Timidina. Posteriormente se efectuó la extracción de Complejos Nucleoprotéicos de SV-40 por la metodología descrita por Varshavsky hasta el paso previo a la sedimentación en el gradiente lineal de sacarosa.

A estos Complejos se les añadió Proteína p-32 del fago T4 a una concentración final de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, y se incubaron durante 60 minutos en agitación suave a 4°C , para permitir la unión de la proteína al ADN de cadena sencilla. Posteriormente se le adicionó Anticuerpo de conejo contra la proteína p-32 a una concentración final de 4 mg/ml y se mantuvo en incubación nuevamente por 60 minutos bajo las mismas condiciones; para después someterlos a sedimentación en el gradiente lineal de sacarosa del 5-25 %, y continuar con la metodología descrita colectando fracciones y cuantificando radioactividad incorporada (^3H y ^{14}C) en 15 μl de cada fracción. La pastilla que quedó en el fondo del tubo se resuspendió en Amortiguador B, en un volumen igual al de cada fracción colectada.

12.- Análisis Electroforético de ADN de SV-40 en gel de Agarosa.

Se preparó una solución de Agarosa al 1 % en Amortiguador de Acetatos (40 mM Tris-Acetatos pH 7.9, 20 mM Acetato de Sodio, 1 mM EDTA), disolviéndola por calentamiento.

Se permitió que la solución se enfriara hasta llegar a 50° C y se le adicionó Bromuro de Etidio a una concentración de 1 ug/ml. Esta solución se vertió a una cámara de Electroforesis horizontal, a la cual se le había colocado previamente un peine formador de pozos de 10 carriles con una capacidad de 80 ul por carril. Una vez solidificada la Agarosa, se retiró el peine y se adicionó a la cámara Amortiguador de Acetatos hasta cubrir completamente el gel.

Posteriormente se prepararon las muestras adicionándoles SDS al 0.1 % y Azul de Bromofenol al 0.01 % en Glicerol al 15 % (en caso de que las muestras carecieran de sacarosa) en concentración final. Se calentaron las muestras a 65° C en baño maría por 5 minutos y se colocó cuidadosamente cada una de ellas en un pocillo del gel. La migración electroforética de las muestras se efectuó aplicando una corriente de 35 volts, 200 mA durante 24 horas a temperatura ambiente con recirculación del Amortiguador. Una vez finalizada la electroforesis, se observó el gel en un transiluminador de luz Ultravioleta de onda corta.

13.- Fluorografía y Autoradiografía de geles de Agarosa.

El gel se sumergió en metanol absoluto manteniéndose por 30 minutos en agitación suave a temperatura ambiente, trasladándose después a un baño de solución de metanol absoluto-10% PPO y permaneciendo en el durante 3 horas. Posteriormente se eliminó el exceso de PPO realizando varios

lavados con metanol usando guantes para facilitar la eliminación de éste, y se permitió la precipitación del PPO absorbido por el gel sumergiendolo en agua bidestilada por 30 minutos y manteniendolo en agitación. Después se colocó el gel sobre papel Whatman y se deshidrató en un desecador de geles a presión reducida durante 2 horas sin calor y aplicando calor por una hora más. Una vez desecado, el gel se colocó con una película de rayos X en un cassette para autoradiografía y se almacenó a -70° C.

14.-Electroforesis en Gel de Poliacrilamida-SDS en gradiente lineal del 5 al 17.5 % (49).

a) Formación del Gel

Se armó una cámara de polimerización con un juego de vidrios perfectamente limpios y desengrasados y sus respectivos espaciadores y se montó sobre un soporte cuidando que sellara completamente tanto en la base como en los extremos, para evitar fugas y se colocó en una superficie plana, nivelando la base hasta asegurar una posición totalmente horizontal. Una vez montada la cámara se instaló un sistema consistente en un formador de gradientes con agitador magnético, conectado a una bomba peristáltica y a la cámara por medio de un tubo de pequeño diámetro. Este sistema permite el control de la formación del gradiente y de la velocidad de flujo de la solución del formador de gradiente a la cámara. Ya listo el sistema, se procedió a preparar en tubos de polivinilo, un

volúmen de 13.5 ml de las soluciones de Acrilamida a concentraciones del 5 y 17.5 % (0.37 M Tris-Hcl pH 8.8, 0.1 % SDS, 5 % o 17.5 % Acrilamida-Bisacrilamida (30Ñ0.8), 5 % Glicerol, 0.04 % TEMED, 0.01 % APS), constituyentes del Gel Separador, se vertieron a las cámaras del formador de gradientes y se abrió la llave de paso que comunica ambas cámaras, haciendo funcionar también el agitador; una vez establecido el flujo entre las cámaras, se abrió la llave de la cámara que contiene la solución de mayor concentración permitiendo así el flujo hasta la cámara de polimerización y la formación del gel en gradiente.

Una vez formado el gradiente se adicionó a la parte superior del gel un volúmen de SDS 0.1 % suficiente para recubrir la superficie, evitando la entrada de Oxígeno y permitiendo la polimerización.

Ya polimerizado el Gel Separador, se retiró el SDS y se lavó 2 veces la superficie del Gel con Agua bidestilada. Se preparó la solución de Acrilamida constituyente del Gel Concentrador (0.125 M Tris-Hcl pH 6.8, 0.1 % SDS, 2.8 % Acrilamida-Bisacrilamida (30Ñ0.8), 2.8 % Glicerol, 0.04 % TEMED, 0.05 % APS) se colocó el peine formador de pozos correspondiente y se añadió la solución, procurando evitar la formación de burbujas entre los carriles del peine. Después de polimerizar el Gel, se retiró cuidadosamente el peine y se lavaron los pozos 2 veces con agua bidestilada, quedando listo el Gel para la aplicación de las muestras y su corrimiento.

b) Preparación de las muestras para corrimiento electroforético en Gel de Poliacrilamida.

Se tomaron fracciones de 100 ul de las muestras obtenidas ya sea del perfil de sedimentación de minicromosomas o bien de lisados celulares totales (en Amortiguador BN25 mM Tris pH 7.9, 2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.2 mM PMSF, 10 % Glicerol), añadiendo a cada una Amortiguador de Muestra ajustandose a una concentración final de 70 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.7 mM 2-Mercaptoetanol, 2.2 % SDS y 0.01 % Azul de Bromofenol, calentando así las muestras a 90° C durante 3 minutos en baño maría .

Posteriormente se colocaron cuidadosamente en el carril correspondiente en el Gel con la ayuda de pipeta Gilson, lo más rápido posible para evitar la difusión de las muestras.

Se colocó el Gel con las muestras inmediatamente en una Cámara de Electroforesis Vertical HS Modelo SE600 conteniendo 800 ml de Amortiguador de Corrida (25 mM Trizma Base, 192 mM Glicina, 0.1 % SDS) y se añadieron cuidadosamente 600 ml del mismo Amortiguador en la parte superior de la Cámara hasta cubrir totalmente el electrodo, haciendo funcionar la fuente de poder y realizando el corrimiento electroforético aplicando una corriente constante de 70 volts con un amperaje inicial de 20 ma, durante 16 o 18 horas. Una vez terminada la corrida se sacó el Gel cuidadosamente usando guantes y se colocó en una bolsa de plástico para después ser teñido o transferido, según las necesidades del experimento.

15.- Electrotransferencia de Proteínas del Gel de Poliacrilamida a Filtros de Nitrocelulosa (75 y 8).

Los Geles a transferirse se equilibraron durante 30 minutos en Amortiguador de Transferencia (25 mM Trizma-Base, 192 mM Glicina, 20 % Metanol) preenfriado a 4° C por 24 horas. Se montó una rejilla en la que se colocó una hoja de papel Whatman 3 mm de las dimensiones de ésta, previamente humedecida en el Amortiguador sobre ella, el Gel perfectamente extendido y evitando la formación de burbujas; encima el filtro de Nitrocelulosa de las dimensiones del Gel, previamente humedecido en el Amortiguador y por último otra hoja de papel Whatman con las mismas características de la primera.

Se cerró la rejilla y se colocó dentro de una Cámara de Transferencia Bio-Rad Modelo Trans Blot Cell ,con agitador, cuidando que el filtro de Nitrocelulosa quedara hacia el polo positivo de ésta. Se añadió el Amortiguador a la Cámara hasta cubrir totalmente la rejilla haciendo funcionar el agitador y aplicando un voltaje constante de 150 volts durante 5 horas, correspondiendo a un amperaje inicial de 500 ma, evitando durante ese lapso de tiempo que la temperatura del Amortiguador se elevara demasiado, con la ayuda de un baño de Etanol-Hielo Seco, realizando la transferencia en un cuarto a 4° C. Finalizada la transferencia, se retiró la rejilla de la Cámara, se tomaron el filtro de Nitrocelulosa y el Gel, con guantes, guardandolos en bolsas de plástico por separado para

después teñir el Gel y realizar la Inmunodetección en el filtro.

16.- Tinción de Geles de Poliacrilamida

Los geles fueron teñidos en ocasiones sin transferir y en otras transferidos, utilizando el método de tinción con Azul de Coomassie en el primer caso, y con Nitrato de Plata en el segundo.

a) Tinción con Azul de Coomassie (84).

Los geles a teñirse se lavaron durante 10 minutos en agitación con agua bidestilada en un recipiente con las dimensiones un poco mayores que las del Gel. Se retiró el agua y se añadieron 50 ml de una solución Teñidora (0.25 % Azul de Coomassie R 250, 45.4 % Metanol, 9.2 % Acido Acético) manteniéndose en ella en agitación suave durante un lapso mínimo de 2 horas.

Posteriormente se cambió esta solución por una solución Desteñidora de Alto Metanol (45.4 % Metanol, 7.5 % Acido Acético) manteniéndose en agitación por 1 hora y cambiandola posteriormente por una solución Desteñidora de Bajo Metanol (5 % Metanol, 7.5 % Acido Acético) y manteniendolo en ella durante 2 horas. El colorante residual se eliminó manteniendo el Gel en agitación en un baño de Metanol al 50 %, hasta aclarar completamente el fondo del Gel y observar las bandas de proteína perfectamente definidas.

b) Tinción con Nitrato de Plata (86).

Los geles a teñirse se mantuvieron en agitación en Metanol al 50 % durante 2 horas. Posteriormente se retiró éste y se mantuvo por 60 minutos en agua bidestilada, realizando dos cambios. Se retiró el agua y se mantuvo nuevamente en agitación con Metanol al 50 % por 2 horas. Se prepararon las soluciones 1 (21 ml NaOH 0.36 % y 1.2 ml NH₄OH) y 2 (0.8 g AgNO₃ en 4 ml de Agua Bidestilada), colocándose la primera en un matraz de 100 ml en agitación y añadiendo la solución 2 gota a gota para posteriormente aforar a 100 ml. Se lavó el gel con agua bidestilada sin dejar pasar más de 5 minutos de Aforada la solución, vertiendola a el y manteniendolo en agitación durante 20 minutos; se retiró la solución decantandola y se lavó el Gel con agua bidestilada en agitación durante 5 minutos.

Una vez transcurrido este tiempo, se decantó el agua y se vació la solución Reveladora (2.5 ml Acido Citrico 1 % + 250 ul Formaldehido 37 % aforado a 500 ml con agua bidestilada) y manteniendose en agitación durante el tiempo necesario para que aparezcan las bandas de proteína teñida (aproximadamente 15 a 20 minutos). Se detuvo el revelado decantando la solución y añadiendo una solución de Acido Acético al 1 %.

17.- Inmunodetección de Proteínas en Filtro de Nitrocelulosa (8, 35 y 30).

El filtro de Nitrocelulosa recién transferido, se colocó en una bolsa de plástico en 15 ml de una solución de

Albúmina Sérica Bovina (ASB) al 3 % en WB (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5 % Triton X-100, 0.2 % SDS) diluido 1:2, y se incubó a temperatura ambiente en agitación durante 14 a 16 horas, con la intención de bloquear los espacios sin proteína del filtro.

Posteriormente se incubó el filtro en 10 ml de una solución de ASB al 1 % en WB concentrado, conteniendo el Anticuerpo dirigido contra la proteína oncogénica a una dilución 1:500, durante un lapso de 3 horas. Transcurrido este tiempo, se decantó la solución y se lavó el filtro con WB concentrado durante 30 minutos realizando 3 cambios del Amortiguador, para eliminar el Anticuerpo no adherido. Se incubó el filtro durante 2 horas con 10 ml de una solución de ASB al 1 % en WB concentrado, conteniendo un Anticuerpo de Conejo, dirigido contra Igs de Ratón a una dilución 1:200.

Terminada la incubación, se volvieron a realizar 3 lavados como se describió anteriormente, y se procedió a realizar un último tratamiento incubando el filtro con 1.5 millones de cpm de 125-I incorporado a Proteína A, en 10 ml de la solución de ASB al 1 % en WB concentrado, en agitación durante 2 horas. Finalmente se realizaron 6 lavados del filtro de la misma manera descrita anteriormente, dejándose después secar a temperatura ambiente durante 30 minutos y colocandolo en una bolsa de plástico adherible (Eggapack). Posteriormente se metió junto con una placa para rayos X en un cassette para autoradiografía y se dejó exponer manteniendolo almacenado a

-70° C durante 48 horas o más, para después revelar la placa y observar las proteínas reconocidas por el anticuerpo en la autoradiografía.

18.- Marcaje de Proteína A Staphylococcal con 125-I (73).

Se montó una columna desechable (Bio-Rad Econo Column) de 0.7 x 15 cm, con Sephadex G-10 previamente hidratado con Amortiguador TEA (50 mM Trietanolamina-HCl pH 8.0), y se equilibró haciendo pasar 3 volúmenes del mismo Amortiguador fresco por ella, cerrándose el flujo hasta su uso. En un tubo Soda Lime RTU desechable (Beckton & Dickinson) se colocaron 20 ul de una solución de Iodogen a una concentración de 1.8 mg/ml en Cloroformo, secándolo y distribuyéndolo homogéneamente en el fondo del tubo con Nitrógeno gaseoso.

En otro tubo 13x100mm se realizó la mezcla de reacción añadiendo en ese orden 275 ul de TEA, 10 ul de HCl 0.1 N, 10 ul NaOH-125I (1 mCi) y 5 ul Proteína A (25 ug)ñ pasando inmediatamente la mezcla al tubo Soda Lime con el Iodogen, manteniéndolo en hielo durante 15 minutos con agitación cada 5. La reacción se detuvo pasando la mezcla al tubo 13x100mm al cual previamente se le adicionaron 5 ul de 2-Mercaptoetanol, y agitando vigorosamente. Una vez detenida la reacción, la mezcla se pasó por la columna, eluyendo con TEA y colectando 16 fracciones de 0.5 ml con un colector de fracciones automático. De cada fracción se tomaron 2 ul y se

cuantificó la radioactividad en un contador gamma, obteniéndose las cpm por ul de cada fracción y determinando así las fracciones correspondientes a proteína A libre, proteína A marcada y radioactividad libre.

Las fracciones conteniendo proteína A marcada se almacenaron a 4° C hasta su uso, desechando el resto de fracciones, la columna y los tubos utilizados durante el marcaje como desechos radioactivos. Todo el procedimiento de Iodinación de proteína A se realiza dentro de una campana de extracción con trampa de carbón activado y utilizando para protección dobles guantes, mandil recubierto con plomo y careta.

RESULTADOS

1.- Inmunodetección de proteínas antigenicamente relacionadas con el producto de varios oncogenes en extractos totales de células de las líneas HeLa y CV-1.

Se realizaron cultivos de ambas líneas celulares en cajas p-100, con el medio de cultivo correspondiente y en presencia de suero fetal de ternera. Cuando las monocapas llegaron a la confluencia (aproximadamente a una densidad celular de 1×10^7 células por caja), se retiró el medio de cada caja y se lavaron dos veces con una solución de PBS a 37°C , añadiéndose posteriormente a cada una 1.0 ml de Amortiguador B (Tris 25 mM pH 7.9, EDTA 2 mM, DTT 0.5 mM, PMSF 0.2 mM, Glicerol 10 %) y raspándolas inmediatamente con un fragmento de hule haciendo alícuotas de 100 μl (1×10^6 células) en tubos de microfuga, congelándolas en Nitrógeno líquido inmediatamente y guardándolas a -70°C hasta el momento de tener el gel de poliacrilamida-SDS listo para correrlo electroforéticamente.

Se corrieron en paralelo dos geles de un solo carril, colocando en uno de ellos el extracto de 2×10^7 cels. HeLa y en el otro la misma cantidad de células CV-1. Una vez realizada la migración electroforética, el contenido protéico de los

geles se electrotransfirió a Filtros de Nitrocelulosa de 0.45 u.

Posteriormente se bloquearon los filtros toda la noche con 3 % ASB en WB, cortandose tiras de 1.0 cm de ancho y realizando la inmunodetección incubando con los anticuerpos monoclonales dirigidos contra diferentes secuencias de aminoácidos de diferentes productos de oncogenes, utilizando un segundo anticuerpo dirigido contra Inmunoglobulinas de ratón y proteína A Staphylococcal marcada con 125-I. Una vez terminada la inmunodetección, las tiras se expusieron con una placa para rayos X en un Cassette de Autoradiografía con pantalla intensificadora a -70° C, revelandola después de 48 horas de exposición.

El resultado obtenido (Figs. 3 y 4) muestra el patrón de reconocimiento de los anticuerpos por diferentes proteínas antigenicamente relacionadas con el producto de los diferentes oncogenes en ambas líneas celulares, entre los que se pueden mencionar los siguientes:

El anticuerpo dirigido contra el producto del oncogene ras (Carriles D), reconoció en ambas líneas celulares, mayoritariamente un péptido de 21 Kd.

El anticuerpo dirigido contra el producto del oncogene sis (Carriles C), reconoce dos péptidos, de 80 y 50 Kd aproximadamente.

Para el producto del oncogene c-myc, se utilizaron dos diferentes anticuerpos, uno dirigido contra la secuencia de

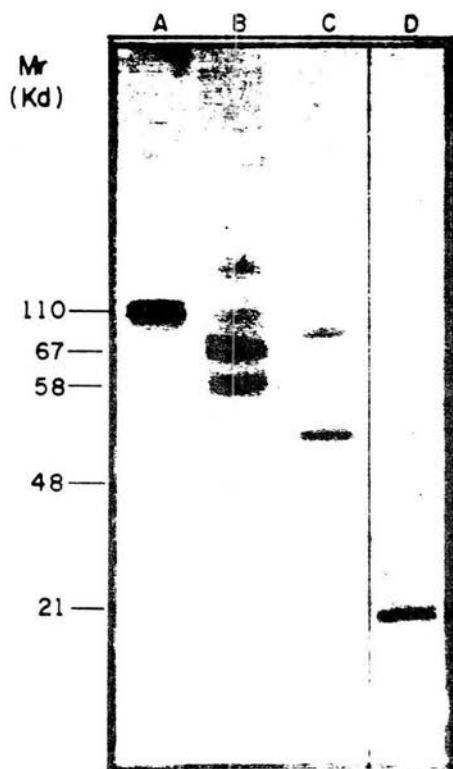


Fig. 1. Inmunodetección de proteínas oncogénicas en células HeLa

- A - Ab anti c-myc (43-55)
- B - Ab anti c-myc (171-188)
- C - Ab anti c-sis
- D - Ab anti c-ras

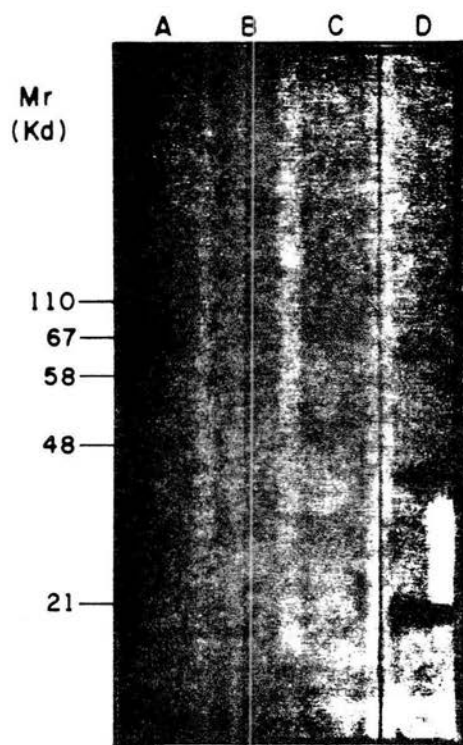


Fig. 4 Inmunodetección de proteínas oncogénicas en cels. CV-1

- A - Ab. anti c-myc (43-55)
- B - Ab. anti c-myc (171-188)
- C - Ab anti c-sis
- D - Ab anti c-ras

aminoácidos 43-55 (A-P-S-E-D-I-W-K-K-F-E-L) y otro contra la secuencia 171-188 (C-S-T-S-S-L-Y-L-Q-D-L-S-A-A-A-S-E-C) de la proteína deducida a partir de la secuencia de nucleótidos que codifican, en los exones 2 y 3 del gene.

El anticuerpo dirigido contra la secuencia de aminoácidos 43-55 (Carriles A), reconoció mayoritariamente un doblete de 110 Kd y un péptido de 48 Kd, mientras que el anticuerpo dirigido contra la secuencia 171-188 (Carriles B), reconoció varios péptidos, entre los cuales resaltan tres, con Mr de 67, 58 y 45-48 Kd.

Para corroborar el reconocimiento de los anticuerpos monoclonales anti c-myc, se realizó un gel de poliacrilamida-SDS en el que en cada pozo se migraron electroforéticamente extractos celulares de 2×10^6 células de una y otra líneas, electrotransfiriendo posteriormente el contenido protéico del gel a filtro de nitrocelulosa, llevando a cabo la inmunodetección. El resultado obtenido (Fig. 5), permite observar que ambos anticuerpos reconocen en la línea celular CV-1 (Carriles B y D) además de los péptidos reconocidos en cels. HeLa, un péptido de 39 Kd.

2.- Propagación de virus SV-40 en cultivos celulares de la línea CV-1.

El virus para propagar se seleccionó de entre varios lotes de acuerdo a la observación de preparaciones de éstos contrastadas por Tinción Negativa, en el microscopio

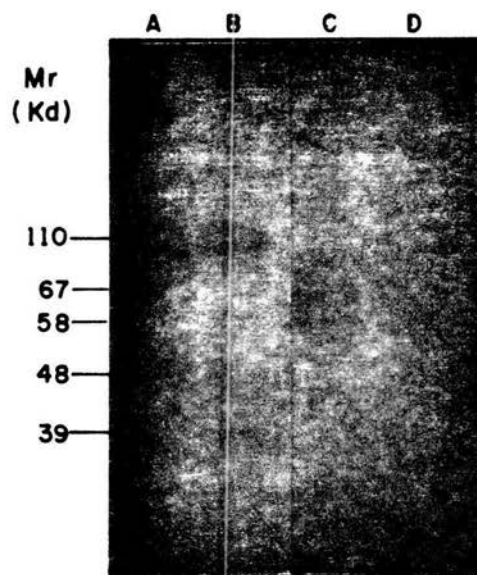


Fig. 5 Inmunodetección de productos antigenicamente relacionados a c-myc en las líneas celulares HeLa (carriles A y C) y CV-1 (carriles B y D)

- A : Cels. HeLa + Anti c-myc (43-55)
- B : Cels. CV-1 + Anti c-myc (43-55)
- C : Cels. HeLa + Anti c-myc (171-188)
- D : Cels. CV-1 + Anti c-myc (171-188)

electrónico, escogiéndose el lote que presentó el más elevado porcentaje de partículas virales potencialmente infectivas (viriones completos con su ADN).

La propagación se efectuó como se describió anteriormente en Material y Métodos, obteniéndose finalmente una suspensión viral de 5.0 ml, de la cual se tomó una alícuota de 10 ul observándose al microscopio electrónico encontrando más de un 90 % de viriones completos (Fig. 6).

La suspensión viral se tituló por el método de Hirt, infectando monocapas de cultivos celulares de la línea CV-1 con diferentes volúmenes de la suspensión viral (desde 0.1 hasta 50 ul) y marcando 24 horas postinfección con 25 uCi de ^3H -Timidina, realizando la extracción de la cromatina viral 40 horas postinfección, precipitándola en papel DE-81 con TCA y Etanol y cuantificando el isótopo incorporado. De esta forma se obtuvo un título indirecto, encontrándose como volumen óptimo para realizar la infección de una caja p-100 de células, 5 ul de la suspensión viral del lote propagado.

También se tituló la suspensión viral por unidades formadoras de placas por la metodología descrita en Material y Métodos, encontrándose un Título viral de 2×10^7 ufp por ul de suspensión viral.

3.- Inmunodetección de proteínas antigenicamente relacionadas con el producto del oncogene c-myc en células CV-1 infectadas con el virus SV-40.

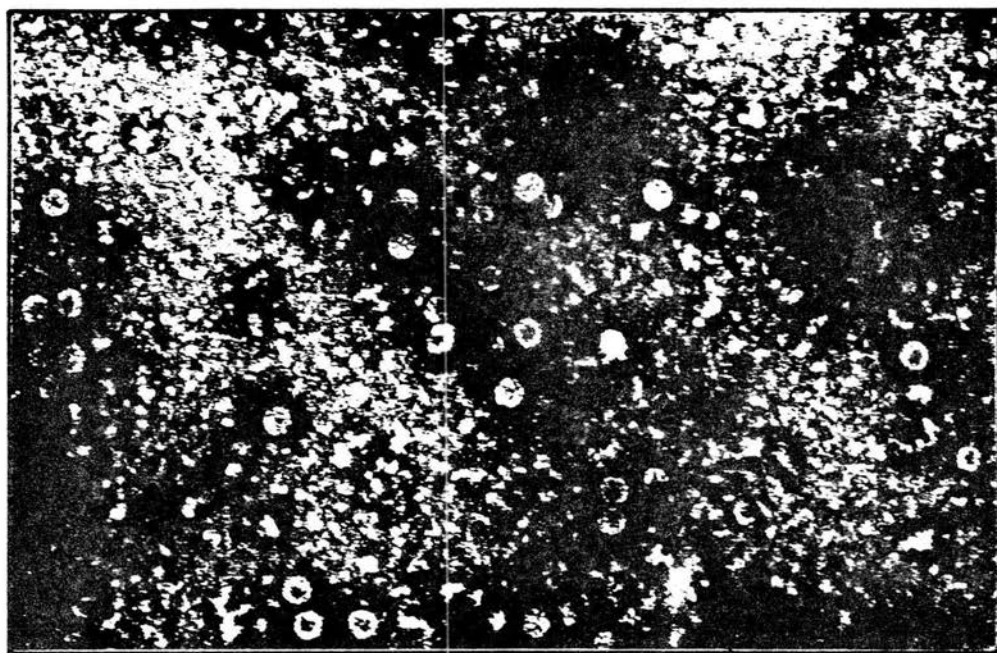


Fig. 6 Observación al Microscopio Electrónico de viriones de SV-40, teñidos con el método de Tinción Negativa.

Se crecieron 5 cajas de células CV-1 hasta llegar a semiconfluencia y se infectó cada una con 5 ul de la suspensión viral (10 ufp/cel).

40 horas postinfección se realizó un fraccionamiento celular, siguiendo los primeros pasos de la metodología descrita por Varshavsky para la extracción de minicromosomas, permitiendo así la obtención de dos fracciones celulares principales: la fracción citoplásmica y la fracción nuclear. Ambas fracciones se dividieron en alícuotas de 100 ul, equivalentes a 1×10^6 células y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido, almacenándose a -70° C hasta el momento de correrlas electroforéticamente en gel de poliacrilamida-SDS. Una vez realizada la electroforesis, se electrotransfirió a filtros de nitrocelulosa, desarrollándose en ellos la inmunodetección utilizando para uno de ellos el anticuerpo monoclonal dirigido contra la secuencia de aminoácidos 43-55 y para otro el anticuerpo dirigido contra la secuencia 171-188. Los resultados obtenidos de la autoradiografía de estos filtros (Fig. 7) muestran lo siguiente:

El anticuerpo monoclonal dirigido contra la secuencia de aminoácidos 43-55 reconoce en la fracción citoplásmica (Carril C) al doblete de 110 Kd y al péptido de 39 Kd mayoritariamente, y al péptido de 48 Kd en menor proporción, mientras que en la fracción nuclear (Carril D) se reconoce el péptido de 48 Kd mayoritariamente.

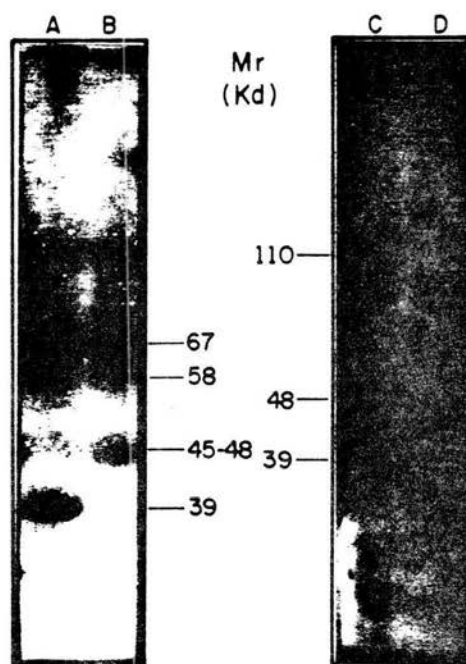


Fig. 7

Inmunodetección de proteínas antigenicamente relacionadas a c-myc en células CV-1 infectadas con el virus SV-40

- A : Citoplasma + Anti c-myc (171-188)
- B : Nucleos + Anti c-myc (171-188)
- C : Citoplasma + Anti c-myc (43-55)
- D : Nucleos + Anti c-myc (43-55)

El anticuerpo dirigido contra la secuencia de aminoácidos 171-188 reconoce en la fracción nuclear (Carril B) mayoritariamente péptidos de 67, 58 y 45-48 Kd, mientras que en la fracción citoplásmica (Carril A) se observa el reconocimiento de los péptidos de 67, 58 y 39 Kd, más no se observa en esta fracción el péptido de 45-48 Kd.

4.- Inmunodetección de proteínas antigenicamente relacionadas con el producto del oncogene c-myc, en minicromosomas de SV-40.

La extracción de minicromosomas se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Varshavsky (Material y Métodos), de 5 cajas de células de la línea CV-1, 40 horas postinfección y 24 horas postmarcaje con ^3H -Timidina, obteniéndose finalmente 20 fracciones del perfil de sedimentación de los minicromosomas en el gradiente de Sacarosa. Se tomaron 15 ul de cada fracción para cuantificar radioactividad incorporada en el material viral, para poder trazar la gráfica del perfil de sedimentación (Fig. 8). El perfil se dividió en 5 regiones, mezclandose las fracciones que correspondieron a cada región, haciendose alícuotas de 100 ul de cada una, congelandolas inmediatamente en nitrógeno líquido y manteniendolas a -70°C hasta su corrimiento electroforético en gel de poliacrilamida-SDS. Una de estas alícuotas se observó al microscopio electrónico

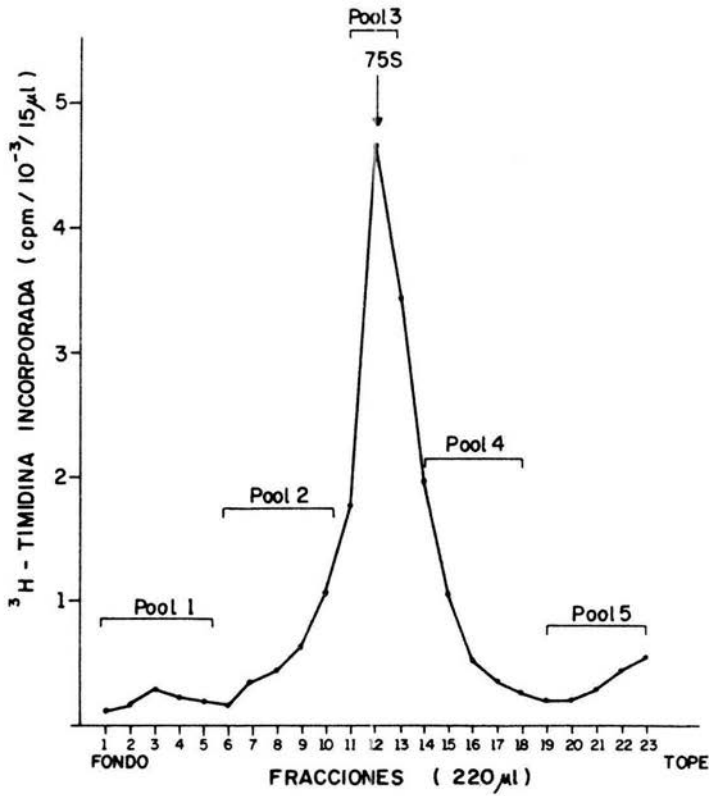


Fig. 8 Perfil de sedimentación de micromosomas de SV-40 en un gradiente de sacarosa

Pool 1	Fracc. 1 → 5
Pool 2	Fracc. 6 → 10
Pool 3	Fracc. 11 → 13
Pool 4	Fracc. 14 → 18
Pool 5	Fracc. 19 → 23

por el método de Dubochet para corroborar la eficiencia del método de extracción (Fig. 9).

Después de la migración electroforética de las diferentes regiones del perfil de sedimentación de los minicromosomas en el gradiente de sacarosa, se electrotransfirió el contenido protéico de los geles a filtros de nitrocelulosa, realizando posteriormente la inmunodetección de proteínas antigenicamente relacionadas con el producto del oncogene c-myc, utilizando ambos anticuerpos monoclonales.

Las autoradiografías de estos filtros (Figs. 10 y 11) permiten observar que el anticuerpo 43-55 reconoce en el perfil de sedimentación de los minicromosomas unicamente el péptido de 48 Kd, migrando éste de manera clara en las fracciones que corresponden a las regiones cercanas al tope del gradiente.

El anticuerpo monoclonal dirigido contra la secuencia de aminoácidos 171-188, reconoció mayoritariamente 2 péptidos que corresponden a 67 y 45-48 kd, migrando el primero de ellos en la región del tope del gradiente y el otro hacia la región donde se obtiene el máximo de incorporación de H-Timidina por los minicromosomas.

5.- Inmunodetección de proteínas antigenicamente relacionadas con el producto del oncogene c-myc en minicromosomas de SV-40 tratados con ARNasa A.

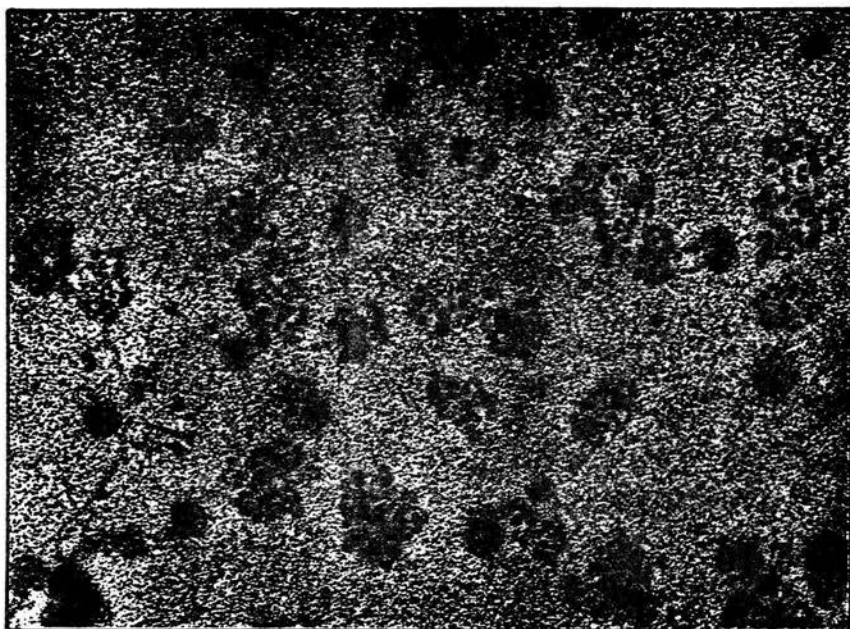


Fig. 9 Observación al Microscopio Electrónico de Minicromosomas de SV-40, teñidos y contrastados por la técnica de Dubochet.

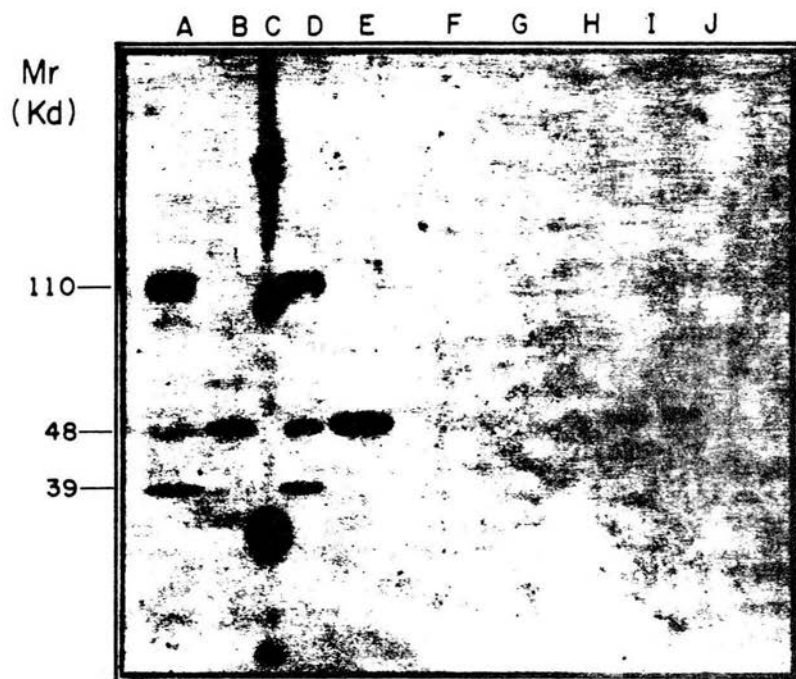


Fig. 10 Inmunodetección de la proteína c-myc con Ab anti c-myc (43-55) en diferentes fracciones celulares obtenidas durante la metodología de extracción de minicromosomas de SV-40A a partir de cels. CVI-40hrs. postinfección y en el perfil de sedimentación de estos en un gradiente de sacarosa 5-25 %

A - Citoplasma	F - Pool 1
B - Núcleos	G - Pool 2
C - Marcador de peso molecular	H - Pool 3
D - Cels. CV-1	I - Pool 4
E - Fondo	J - Pool 5

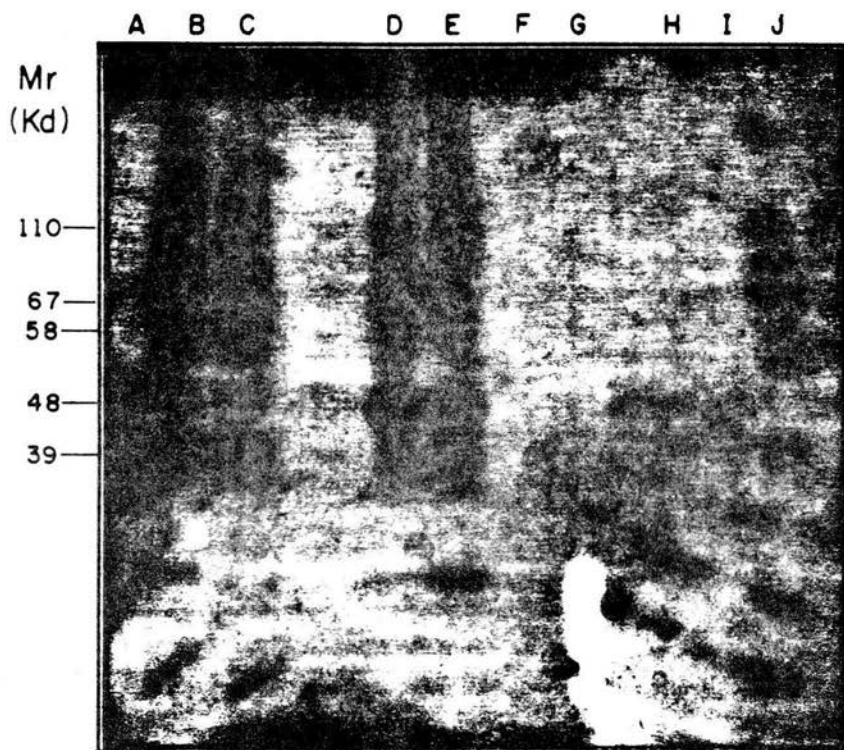


Fig. 11 Inmunodetección de la proteína c-myc con Ab anti c-myc (171-188) en diferentes fracciones celulares obtenidas durante la metodología de extracción de minicromosomas de SV-40 a partir de cels. CV-1 40 hrs. postinfección y en el perfil de sedimentación de estos en un gradiente de sacarosa 5 - 25 %

A - Marcador de peso molecular	F - Pool 1
B - Cels. CV-1	G - Pool 2
C - Núcleos	H - Pool 3
D - S. N. Varshavsky	I - Pool 4
E - Prec. Varshavsky	J - Pool 5

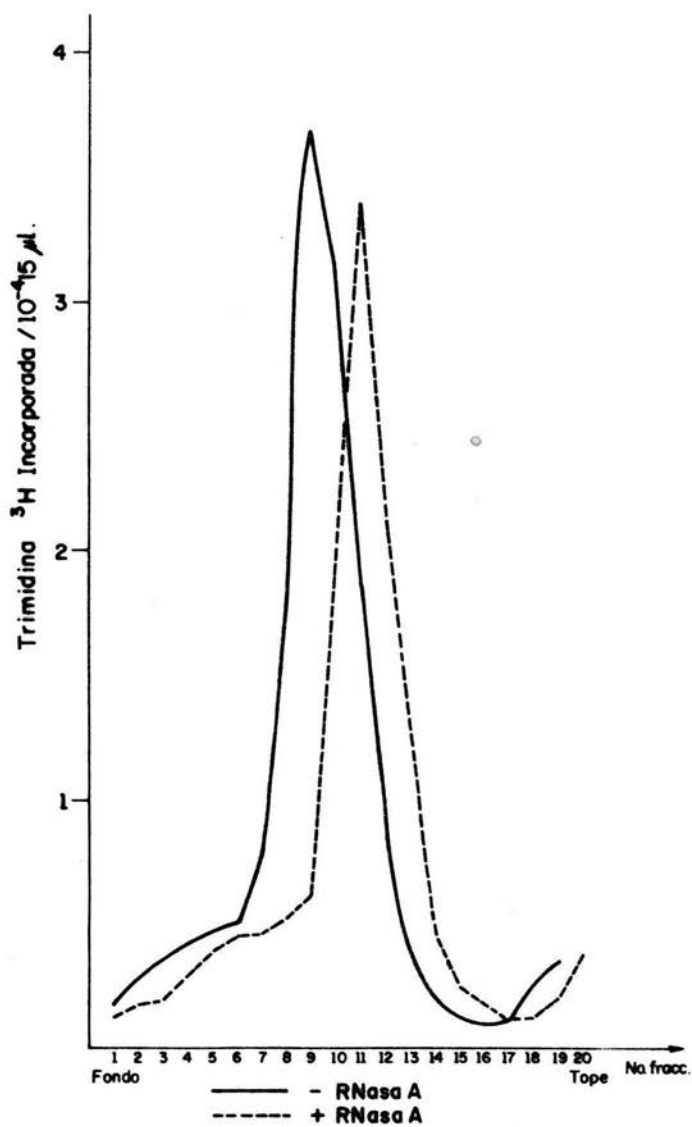
Se realizó la extracción de minicromosomas de 10 cajas de células de la línea CV-1 infectadas con el virus SV-40, siguiendo la metodología descrita por Varshavsky (Material y Métodos).

Una vez habiendo separado los minicromosomas de la cromatina celular, el volumen total se dividió en dos partes iguales, para el tratamiento con ARNasa A. A una de ellas se le adicionó ARNasa A a una concentración final de 4 ug/ml y de inmediato se sometieron ambas a una incubación de 20 minutos a 4° C. Una vez transcurrido ese tiempo, se realizó la sedimentación de ambas muestras en dos gradientes de sacarosa, colectándose posteriormente las 20 fracciones de cada una, cuantificándose después la incorporación de ³H-Timidina en 15 ul de cada fracción, para obtener la gráfica del perfil de sedimentación de ambas muestras (Fig. 12), observándose en ella un ligero desplazamiento del pico de incorporación de H-Timidina hacia las fracciones del tope del gradiente.

Ambos perfiles se dividieron en 5 regiones, se mezclaron las fracciones correspondientes a cada región, y se hicieron alícuotas de 100 ul de cada una, congelándose inmediatamente en nitrógeno líquido y manteniéndose a -70° C hasta su corrimiento electroforético en gel de poliacrilamida-SDS.

Después de la migración electroforética de las muestras en el gel, el contenido protéico de éste se electrotransfirió a filtro de nitrocelulosa, realizándose la

Fig.12.- Perfil de Sedimentación de minicromosomas de SV-40 del ensayo +/- ARNasa A. Línea cortada, perfil de sedimentación de minicromosomas tratados con ARNasa A; Línea continua, perfil de sedimentación de minicromosomas no tratados.



inmunodetección con los anticuerpos monoclonales dirigidos contra las secuencias de aminoácidos 43-55 y 171-188.

La autoradiografía del filtro correspondiente a la inmunodetección con el anticuerpo monoclonal dirigido contra la secuencia de aminoácidos 171-188 (Fig. 13) permite observar en los minicromosomas tratados con ARNasa A un ligero desplazamiento del péptido de 45-48 Kd hacia las fracciones del fondo del gradiente, mientras que la proteína de 67 Kd no sufre ninguna modificación en su migración en el gradiente, manteniéndose en las fracciones del tope, observándose además una disminución de la cantidad total de proteínas con respecto a los minicromosomas no tratados.

La autoradiografía del filtro correspondiente a la inmunodetección con el anticuerpo dirigido contra la secuencia de aminoácidos 43-55 (Fig. 14) permite observar un efecto muy similar al descrito anteriormente, ahora con el péptido de 48 Kd, el cual se desplaza hacia las fracciones del fondo del gradiente en minicromosomas tratados con ARNasa, reconociéndose además una proteína de 67 Kd que no había sido reconocida anteriormente.

6.- Inmunodetección de proteínas antigenicamente relacionadas con el producto del oncogene c-myc en Complejos Replicativos de Minicromosomas de SV-40.

Los minicromosomas de SV-40 se obtuvieron de la misma manera descrita anteriormente, realizando la

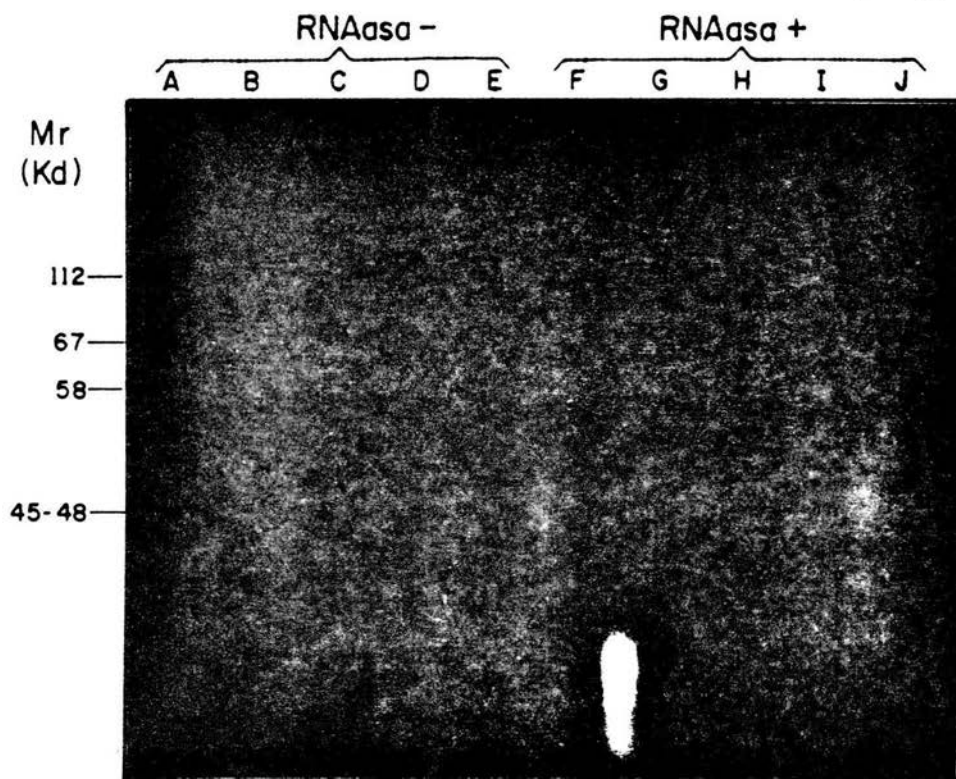


Fig. 13. Inmunodetección de proteínas antigenicamente relacionadas con c-myc en el perfil de sedimentación de Minicromosomas de SV-40_T por medio del anticuerpo anti c-myc(171-188).

RNAasa -	RNAasa +
A : Pool 1	F : Pool 1
B : Pool 2	G : Pool 2
C : Pool 3	H : Pool 3
D : Pool 4	I : Pool 4
E : Pool 5	J : Pool 5

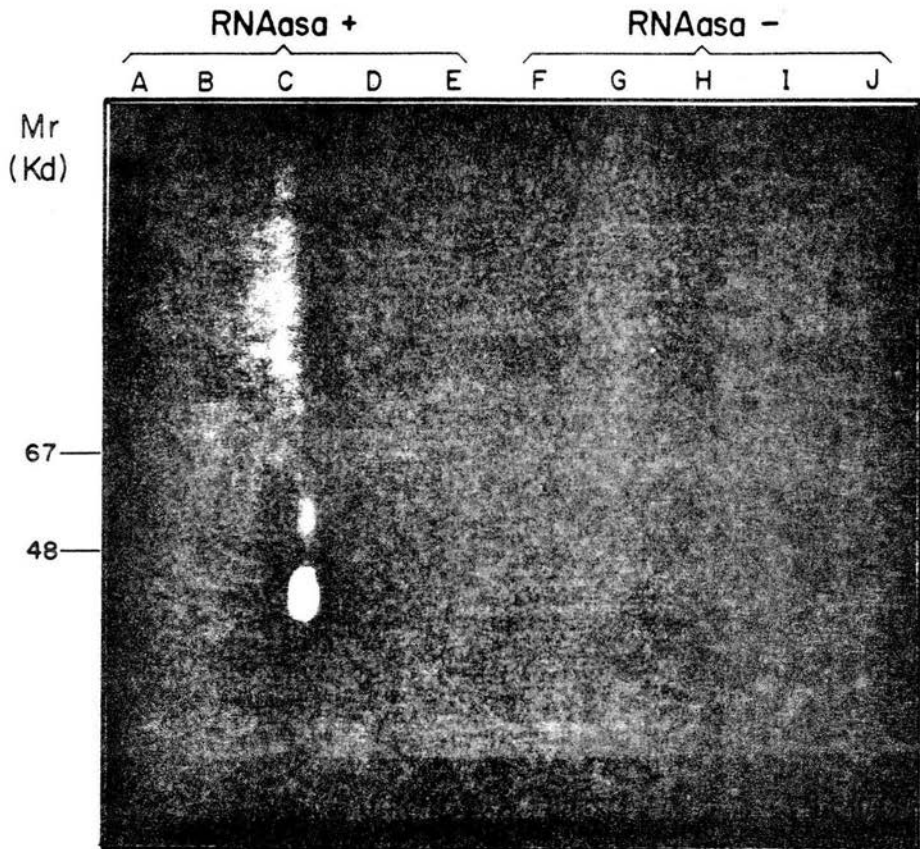


Fig. 14 Inmunodetección de proteínas antigénicamente relacionadas con c-myc en el perfil de sedimentación de Minicromosomas de SV-40, por medio del anti-cuerpo anti-c-myc (43-55)

RNAasa +

A: Pool 1
 B: Pool 2
 C: Pool 3
 D: Pool 4
 E: Pool 5

RNAasa -

F: Pool 1
 G: Pool 2
 H: Pool 3
 I: Pool 4
 J: Pool 5

inmunoprecipitación de los Complejos Activos en Replicación por medio de la incubación del total de los minicromosomas extraídos, con la proteína p-32 del bacteriofago T4, que tiene la característica de unirse específicamente al ADN de cadena sencilla, y anticuerpos policlonales de conejo dirigidos contra ésta (Fig. 15).

Una vez precipitados los Complejos Replicativos se sometió el total de la muestra, junto con una muestra de minicromosomas marcados de la misma forma pero sin someter a inmunoprecipitación, a sedimentación en gradiente lineal de sacarosa 5-25 %, obteniéndose al cuantificar en 15 ul de cada fracción la incorporación de ^3H y ^{14}C -Timidina. Las gráficas de ambos perfiles de sedimentación (Figs. 16 y 17) muestran claramente que en la muestra de minicromosomas tratados con proteína p-32 y anticuerpos contra esta, la mayoría del ^3H -Timidina se localiza en el fondo del gradiente, lo que permite suponer que se trata de los complejos replicativos de SV-40.

Para corroborar este resultado, se tomaron alícuotas de 70 ul de las fracciones correspondientes a los picos de incorporación de ^3H -Timidina y ^{14}C -Timidina, corriendolos electroforeticamente en gel de agarosa como se describió en Material y Métodos.

El resultado obtenido de este gel, tanto en su observación en transiluminador ultravioleta (Fig. 18), como en su autoradiografía después de dos semanas de exposición (

Fig.15.- Metodología de inmunoprecipitación de Complejos Replicativos de SV-40, mediante la utilización de proteína p-32 del fago T4 y anticuerpos dirigidos contra esta.

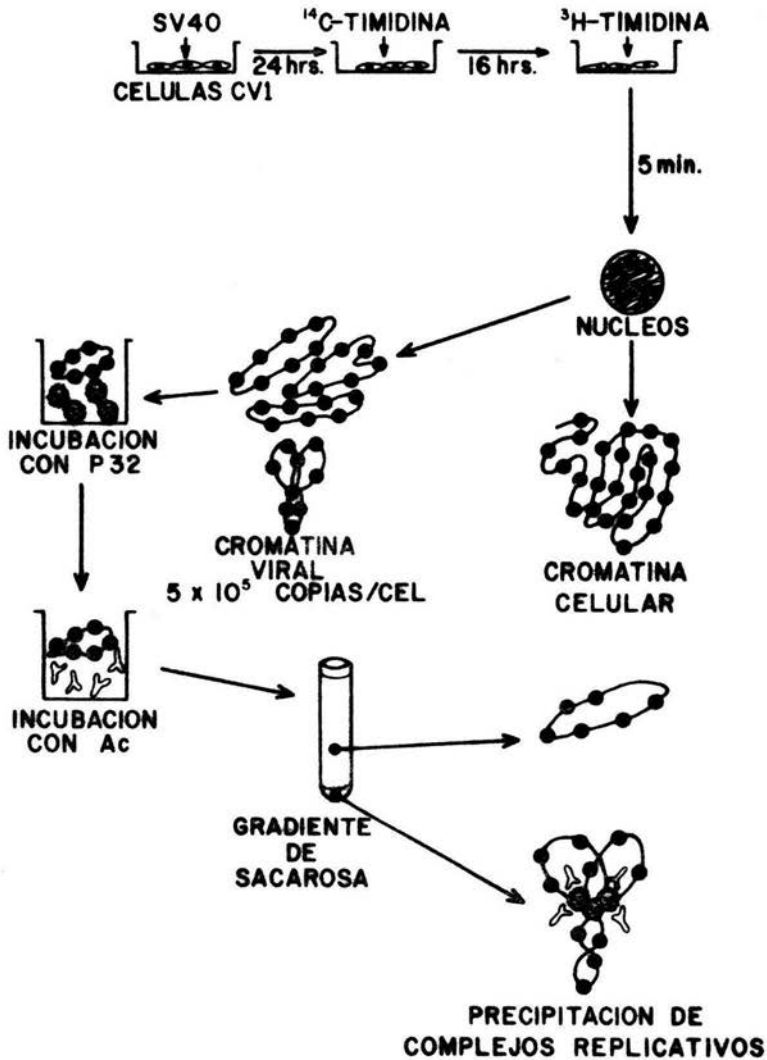


Fig.16.- Perfil de sedimentación de minicromosomas de SV-40, con marcaje largo de ^{14}C -Timidina y un pulso de 5 minutos antes de la extracción con ^3H -Timidina. Circulos vacios, incorporación de ^3H -Timidina; Triangulos negros, incorporación de ^{14}C -Timidina. El Pulso de 5 minutos marca diferencialmente los minicromosomas activos en replicación.

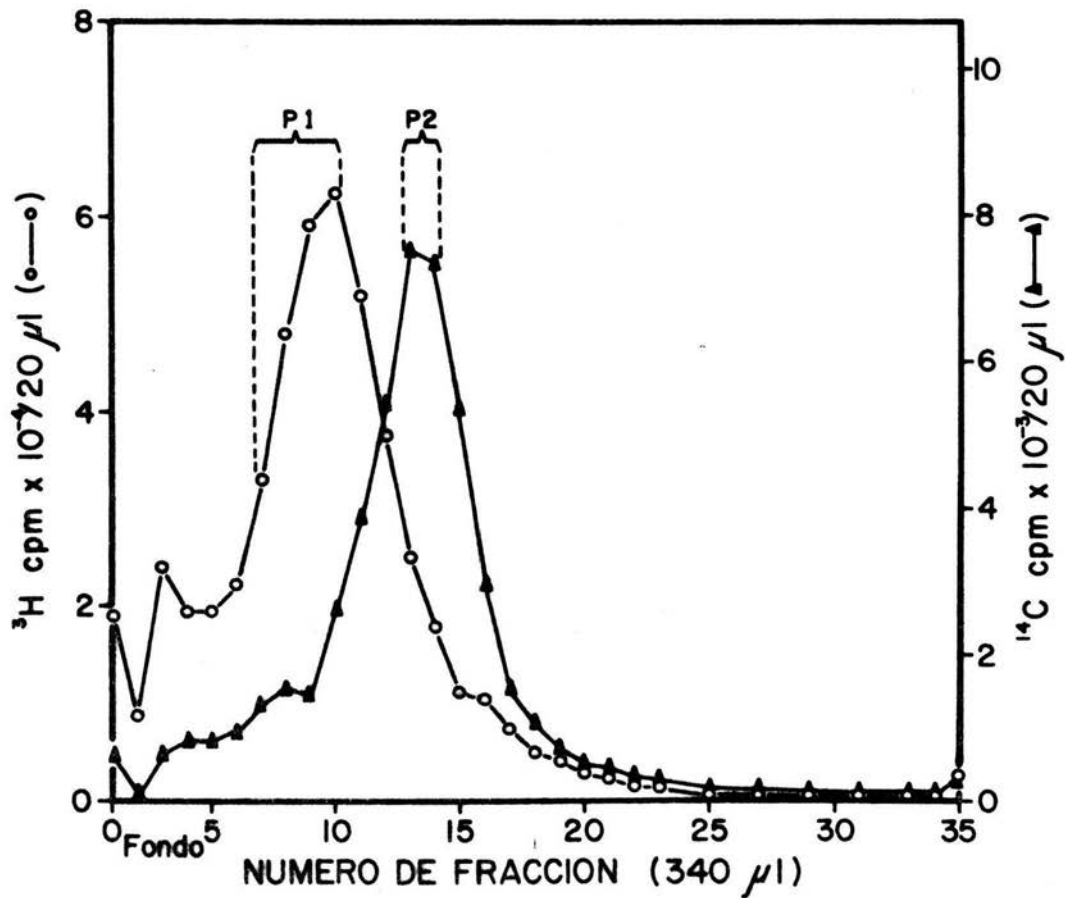
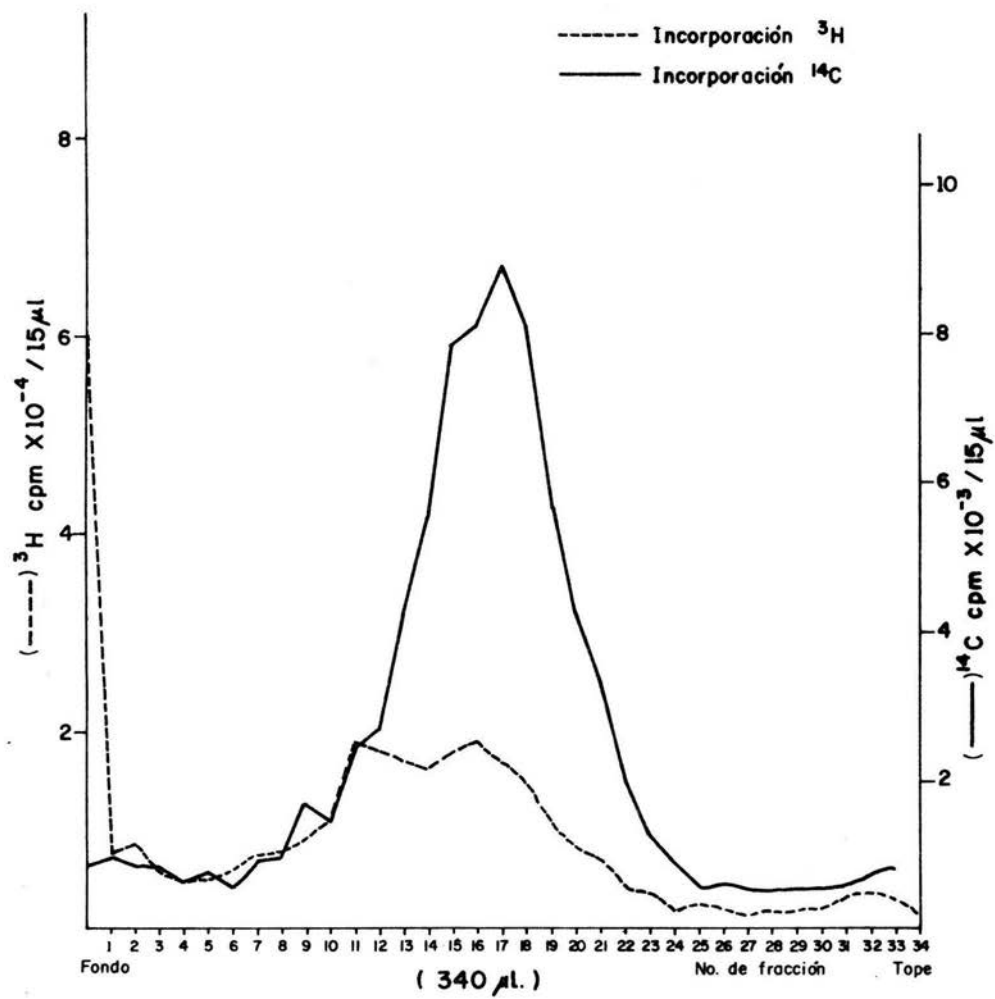


Fig.17.- Perfil de sedimentación de minicromosomas de SV-40 tratados con proteína p-32 del fago T4 y anticuerpos dirigidos contra esta, después de un marcaje largo de ^{14}C -Timidina y un pulso de 5 minutos antes de la extracción con ^3H -Timidina. Línea cortada, incorporación de ^3H -Timidina; Línea continua, incorporación de ^{14}C -Timidina.



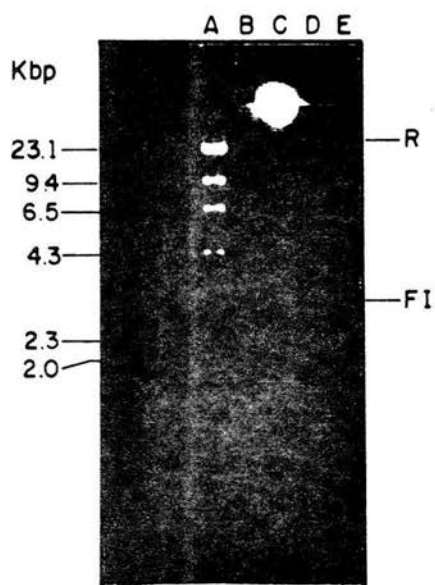


Fig. 18 Migración Electroforética en gel de agarosa de varias fracciones de la precipitación de complejos replicativos.

- A - λ -Hind III
- B - Minicromosomas totales
- C - Nucleos totales
- D - Complejos replicativos (Fondo del gradiente)
- E - Minicromosomas Maduros (Fracc. 15 del gradiente)

Fig. 19), permite asegurar la eficiencia del sistema protefna p-32 - anti p-32 para obtener la población enriquecida de minicromosomas activos en replicación, ya que estos se observan claramente en la fracción precipitada con la mayoría del ^3H -Timidina (Carril D en ambas figuras), mientras que en la fracción 15 correspondiente al pico de incorporación de ^{14}C -Timidina solo se observan complejos maduros (Carril E en ambas figuras).

En el total de minicromosomas antes de la inmunoprecipitación (Carril B en ambas figuras), también se observan unicamente minicromosomas maduros.

Las fracciones correspondientes se corrieron electroforeticamente en gel de poliacrilamida-SDS y el contenido del gel se electrotransfirió a filtros de nitrocelulosa. Después de realizar la inmunodetección con los anticuerpos monoclonales dirigidos contra las secuencias de aminoácidos 43-55 y 171-188 del producto del oncogene c-myc, se obtuvo la autoradiografía (Fig. 20) en la que se observó que ambos anticuerpos reconocen en los complejos replicativos un solo péptido con Mr de 67 Kd (Carriles A y C), además de un péptido correspondiente a las cadenas pesadas de las Igs de Conejo, con Mr de 55 Kd, y un péptido de mayor peso molecular (Aprox. 98 Kd).

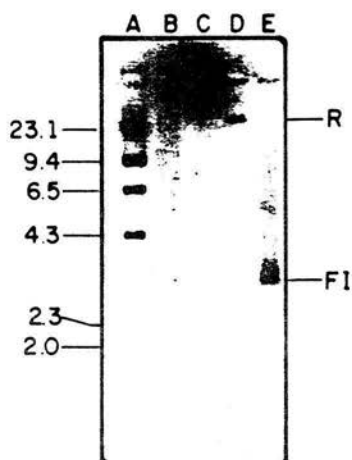


Fig. 19 Autoradiografía de la migración electroforética en gel de Agarosa de varias fracciones del Proceso de precipitación de complejos replicativos

- A - λ -Hind III
- B - Micromosomas totales
- C - Nucleos
- D - Complejos replicativos (Fondo del gradiente)
- E - Micromosomas maduros (Fracc. 15 del gradiente)

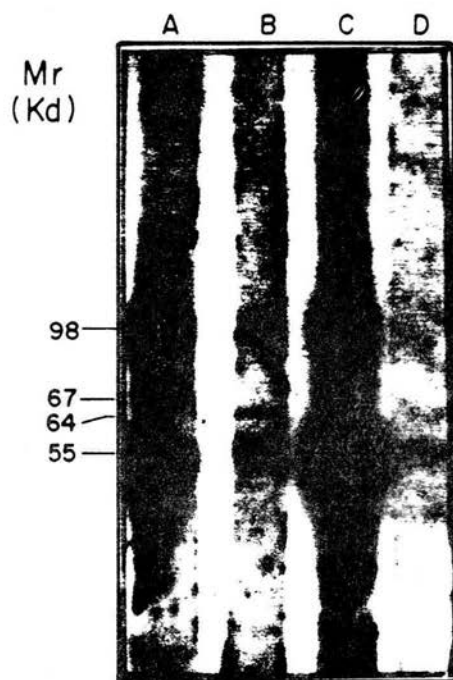


Fig. 20 Inmunodetección de proteínas antigenicamente relacionadas con c-myc en complejos replicativos y maduros.

- A - Complejos replicativos + Anti c-myc (171-178)
- B - Minicromosomas maduros + Anti c myc (171-178)
- C - Complejos replicativos + Anti c myc (43-55)
- D - Micromosomas maduros + Anti c-myc (43-55)

DISCUSION

El oncogene c-myc esta constituido por dos intrones y tres exones, de los cuales, de acuerdo a la secuencia de nucleótidos del gene deducida por Watt R. desde 1983 (82) se considera que solo los dos últimos exones son traducidos a proteína. La secuencia de nucleótidos que codifican en estos exones, permite deducir una proteína que de esta forma correspondería a un peso molecular de 48,000 Daltones. Sin embargo, las Mr. de las proteínas identificadas por algunos autores como el producto de c-myc varian desde el mismo peso deducido (34) hasta los 67,000 Daltones (37), argumentando que se trata de una migración anómala en su corrimiento en geles de poliacrilamida-SDS, debido a su alto contenido de prolinas.

La gran mayoría de las proteínas identificadas de esta forma como el producto del oncogene c-myc presentan características muy semejantes como son su localización mayoritariamente nuclear, elevada afinidad por ADN de doble cadena, su alto nivel de fosforilación, su vida media limitada de 20 a 30 minutos y la presencia de dominios conservados evolutivamente.

Sin embargo, actualmente y por consenso general se considera que el peso molecular de la proteína es de 62,000 Daltones, y que las diferentes variaciones en su Mr.

corresponden a modificaciones a nivel de fosforilación de ella en algunos casos y a efectos de su manipulación durante las metodologías usadas para su detección.

Recientemente, Gazin y cols.(33) han demostrado la existencia de un pequeño péptido codificado por el primer exon del gene, más la mayoría de los investigadores han continuado concentrando su atención sobre el producto del segundo y tercer exon, ya que al primer exon del gene se le atribuyen funciones regulatorias.

Con respecto al papel funcional del producto del oncogene c-myc existen varios grupos que han abordado el tema desde diferentes puntos de vista, principalmente realizando ensayos de transfección en líneas celulares que se conoce tienen alguna alteración en el oncogene que provoca una elevada producción de la proteína, y midiendo su efecto en el plásmido transfectado. Este tipo de ensayos han sugerido que el producto del oncogene c-myc esta implicado en la promoción de la replicación celular (41), y muy posiblemente también participa en la regulación de la transcripción de algunos genes específicos, como el que codifica para la proteína de choque térmico 70 (44).

En este trabajo, se intentó dilucidar el papel funcional del producto del oncogene c-myc utilizando una estrategia diferente, en la cual, primeramente se realizó la detección del producto del oncogene en lisados celulares totales, para después utilizar a SV-40 como sistema modelo y detectar en el

la presencia del producto del oncogene, utilizando fundamentalmente la metodología de electrotransferencia e inmunodetección con anticuerpos monoclonales.

La elección de los anticuerpos monoclonales utilizados para realizar la inmunodetección del producto del oncogene c-myc se realizó de acuerdo a varias características reportadas en la bibliografía reciente: la secuencia de aminoácidos 43-55, pertenece a una región de la proteína que se ha observado tiene una elevada conservación en la escala filogenética (65), mientras que anticuerpos dirigidos contra la secuencia de aminoácidos 171-188 han sido ampliamente utilizados por diversos autores (24) para identificar el producto del oncogene c-myc. Sin embargo, cabe mencionar que la mayoría de los reportes en los que se realiza inmunodetección con estos anticuerpos, trabajan casi exclusivamente con extractos nucleares, lo que lleva a una mayor manipulación de las proteínas, siendo en cierta forma esto una desventaja cuando se trata de detectar una proteína inestable y de vida media muy corta.

Por este motivo, nuestro primer objetivo fue el detectar proteínas antigenicamente relacionadas con el producto del oncogene c-myc en lisados totales de las líneas celulares HeLa y CV-1, y como puede observarse (Fig. 5), se identifican varias proteínas en ambas líneas, pero este reconocimiento

resulta bastante complejo, ya que hay proteínas que son detectadas por un anticuerpo pero no por el otro.

Al parecer, las únicas proteínas reconocidas en común por ambos anticuerpos son en la Línea celular HeLa la de 48 Kd, aunque la reconocida por el anticuerpo 171-188 parece tener una migración electroforética un poco mayor (45-48 Kd), y en ocasiones reconoce debilmente la proteína de 110 Kd.

En la línea celular CV-1 además de estas proteínas, una de Mr. de aproximadamente 39 Kd. Posiblemente las proteínas de 67 y 58 Kd que no son detectadas en común sean debidas a la diferente afinidad de los anticuerpos. Sin embargo, se han reportado pesos moleculares muy similares para la proteína c-myc.

Para conocer la localización de las proteínas detectadas por los anticuerpos, se realizó un fraccionamiento celular en la línea CV-1 para obtener material citoplásmico y nuclear por separado (Fig. 7). De esta forma, pudo observarse que de las proteínas reconocidas por el anticuerpo dirigido contra la secuencia de aminoácidos 43-55, unicamente la de 48 Kd tiene una localización mayoritariamente nuclear, mientras que de las proteínas reconocidas por el anticuerpo dirigido contra la secuencia de aminoácidos 171-188, solo la proteína de 45-48 Kd es exclusivamente nuclear, en tanto que las de 67 y 58 se pueden localizar tanto en citoplasma como en núcleo.

Este resultado permite descartar como el producto del oncogene c-myc, por su localización intracelular a las

proteínas de 110 y 39 Kd, más puede sugerir la posibilidad de que la primera sea un precursor que al ser procesado vaya al núcleo, y la segunda, un producto de un procesamiento posterior de la proteína myc, que viaja después de este al citoplasma. Es importante tomar en cuenta que estas proteínas son reconocidas por ambos anticuerpos, y que su relación antigénica con el producto del oncogene c-myc es bastante elevada.

Existen algunos trabajos en los que se han reportado proteínas antigenicamente relacionadas con el producto de c-myc de Mr muy aproximadas, como es el caso de la detección de la proteína de fusión gag-myc con un peso de 110 Kd en células infectadas con el virus MC29 (55), o una proteína detectada en muestras de suero de pacientes con tumores sólidos con un peso de 40 Kd (10).

Cuando se realizó la inmunodetección de proteínas antigenicamente relacionadas con el producto del oncogene c-myc en minicromosomas de SV-40 sometidos a sedimentación en gradiente lineal de sacarosa del 5 al 25 %, pudo observarse que con el anticuerpo dirigido contra la secuencia de aminoácidos 43-55 (Fig. 10) se detectó en ellos exclusivamente la proteína de 48 Kd, migrando en las fracciones correspondientes a la región cercana al tope del gradiente, mientras que cuando se realizó la inmunodetección con los anticuerpos dirigidos

contra la secuencia de aminoácidos 171-188 (Fig. 11) se observó que la proteína de 67 Kd se queda en el tope del gradiente, mientras que la de 45-48 Kd se observa exclusivamente en la región de máxima incorporación de H-Timidina en la que se encuentran los minicromosomas maduros.

Este resultado puede sugerir dos cosas: que la proteína de 48 Kd detectada por el anticuerpo dirigido contra la secuencia 43-55, no es la misma que la de 45-48 detectada por el anticuerpo dirigido contra la secuencia 171-188, siendo esta última una proteína con afinidad elevada por ADN de doble cadena, uniéndose así a los minicromosomas maduros.

Otra opción posible, es que ambos anticuerpos detecten la misma proteína, pero que ésta no este fuertemente unida a los minicromosomas maduros y que siendo las inmunodetecciones de ensayos diferentes, cuando se realizó con el anticuerpo dirigido contra la secuencia 43-55, la proteína se haya desprendido del ADN viral durante la centrifugación en el gradiente.

Al tratar los minicromosomas con ARNasa A y someterlos a sedimentación en gradiente lineal de sacarosa del 5 al 25 %, se observó primeramente un desplazamiento del pico de incorporación de H-Timidina hacia las fracciones del tope del gradiente (Fig. 12) con respecto a los minicromosomas no tratados. Esto fué debido a que el ARN de los minicromosomas en transcripción fue digerido por la enzima, volviéndose más ligeros y migrando menos en el gradiente de sacarosa.

En cuanto a la inmunodetección de proteínas antigenicamente relacionadas con el producto del oncogene c-myc en el perfil de sedimentación de los minicromosomas tratados con ARNasa A, pudo observarse que con ambos anticuerpos se detectó un desplazamiento de la proteína de 45-48 Kd (Fig. 13) o 48 Kd (Fig. 14), según el anticuerpo utilizado, mientras que la proteína de 67 Kd detectada anteriormente con uno solo de los anticuerpos (171-188), ahora es detectada por ambos, permaneciendo inalterada en su patrón de migración en el gradiente de sacarosa.

Este resultado permite sugerir que la(s) proteína(s) identificada(s) de 48 y/o 45-48 Kd participa(n) en la transcripción de los minicromosomas de alguna manera, ya que se encuentra(n) unida(s) al ARN viral, y al digerir éste, tiende(n) a migrar hacia la región del gradiente correspondiente a los minicromosomas activos en replicación y transcripción.

Con respecto a la proteína de 67 Kd, que es detectada ahora por los dos anticuerpos, se puede decir que al no verse alterada su migración en el gradiente al tratar con ARNasa A, no se encuentra unida al ARN, aunque su asociación con ADN no se puede descartar, debido a que posiblemente se haya asociada,

pero en muy bajas cantidades, por lo cual no es detectada en las regiones del perfil de sedimentación de los minicromosomas, correspondientes a minicromosomas maduros ni activos en replicación y transcripción.

Para saber si la(s) proteína(s) de 48 y/o 45-48 Kd, o la proteína de 67 Kd antigénicamente relacionadas a c-myc participan en la replicación de los minicromosomas de SV-40, se realizó la obtención de Complejos Replicativos mediante su inmunoprecipitación con proteína p-32 y anticuerpos policlonales dirigidos contra ella.

Al realizar la inmunodetección de proteínas antigénicamente relacionadas con el producto del oncogene c-myc en los complejos replicativos (Fig. 20), pudimos detectar con ambos anticuerpos tres proteínas con Mr de 98, 67 y 55 Kd.

Los péptidos detectados de Mr 55 y 98 Kd, corresponden muy probablemente a las cadenas pesadas de las Igs y a formas dimericas de estas cadenas de los anticuerpos de conejo dirigidos contra la proteína p32. Estos péptidos son detectados debido a que la Proteína A Staphylococcal tiene una elevada afinidad por la región Fc de las Igs de conejo, y las cadenas pesadas de las Igs constituyen precisamente esta región.

De esto, podemos deducir que el único péptido reconocido por ambos anticuerpos en los Complejos Replicativos es el de Mr

de 67 Kd y que por lo tanto, esta proteína antígenicamente relacionada con el producto del oncogene c-myc, tiene afinidad por el ADN viral, y muy probablemente se encuentra involucrada en la Replicación de los Minicromosomas de SV-40, ya que se puede detectar unida a tales complejos.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo, se identificaron varias proteínas antigenicamente relacionadas con el producto del oncogene c-myc, que son reconocidas por dos anticuerpos monoclonales dirigidos contra diferentes regiones de dicho producto. Dos de estas proteínas tienen una Mr de 48 y/o 45-48 Kd y 67 Kd.

La proteína que corresponde a una Mr de 48 y/o 45-48 Kd tiene localización mayoritariamente nuclear dentro de la célula, presentando afinidad por ADN de doble cadena y probablemente se encuentra implicada en la transcripción de Minicromosomas de SV-40, ya que se observó que su sedimentación es afectada por tratamiento con ARNasa A.

La proteína que corresponde a una Mr de 67 Kd, tiene localización intracelular al parecer tanto citoplásmica como nuclear, sin embargo, se encontró unida a Complejos de Minicromosomas Activos en Replicación, por lo que muy probablemente este implicada en el proceso de replicación del virus.

Ambas proteínas, comparten las características reportadas hasta hoy para el producto del oncogene c-myc, lo que parece sugerir, que existen diferentes formas de esta proteína, con variaciones en su masa relativa debido muy probablemente a modificaciones postraduccionales, que

determinan su participación en los procesos de replicación y transcripción.

FIGURAS

1.- El gene c-myc. Exones (I, II y III), Promotores (P0, P1 y P2) y promotores crípticos (Flechas cerca del exon II).

2.- El genoma del virus SV-40. Orígen de Replicación (ori).

3.- Reconocimiento de diferentes anticuerpos monoclonales dirigidos contra productos de oncogenes, en lisados totales de cels. HeLa. Carriles: A, incubación con anti c-myc 43-55; B, incubación con anti c-myc 171-188; C, incubación con anti c-sis; D, incubación con anti c-ras. Mr = Masa relativa en Kilodaltones.

4.- Reconocimiento de diferentes anticuerpos monoclonales dirigidos contra productos de oncogenes, en lisados totales de cels. CV-1. Carriles: A, incubación con anti c-myc 43-55; B, incubación con anti c-myc 171-188; C, incubación con anti c-sis; D, incubación con anti c-ras.

5.- Inmunodetección de proteínas antigenicamente relacionadas con el producto del oncogene, con Ab anti c-myc 43-55 y 171-188 en lisados totales de las líneas celulares HeLa y CV-1. Carriles: A, incubación de lisados totales de celulas HeLa con anti c-myc 43-55; B, lisados totales de

celulas CV-1 con anti c-myc 43-55; C, lisados totales de celulas HeLa con anti c-myc 171-188; D, lisados totales de celulas CV-1 con anti c-myc 171-188.

6.- Observación al Microscopio Electrónico de viriones de SV-40, teñidos con el método de Tinción Negativa.

7.- Inmunodetección de proteínas antigenicamente relacionadas con el producto del oncogene c- myc con Ab anti c-myc 43-55 y 171-188 en fracciones citoplásmicas y nucleares de celulas CV-1 infectadas con el virus SV-40. Carriles: A, fracción citoplásmica de celulas CV-1 con anti c-myc 171-188; B, fracción nuclear de células CV-1 con anti c-myc 171-188; C, fracción citoplásmica de células CV-1 con anti c-myc 43-55; D, fracción nuclear de células CV-1 con anti c-myc 43-55.

8.- Perfil de sedimentación de minicromosomas de SV-40 en gradiente lineal de sacarosa 5-25 %. Pool 1, fracciones 1 a 5; Pool 2, fracciones 6 a 10; Pool 3, fracciones 11 a 13; Pool 4, fracciones 14 a 18; Pool 5, fracciones 19 a 23.

9.- Observación al Microscopio Electrónico de Minicromosomas de SV-40, teñidos y contrastados por la técnica de Dubochet.

10.- Inmunodetección de proteínas antigenicamente relacionadas con el producto de c-myc con el anticuerpo

dirigido contra la secuencia de aminoácidos 43-55, en el perfil de sedimentación de minicromosomas en gradiente lineal de sacarosa del 5 al 25 %. Carriles: A, citoplasma; B, núcleos; C, Marcador de peso molecular; D, lisado total de cels. CV-1; E, fondo del tubo; F, Pool 1; G, Pool 2; H, Pool 3; I, Pool 4; J, Pool 5.

11.- Inmunodetección de proteínas antigenicamente relacionadas con el producto del oncogene c-myc con el anticuerpo dirigido contra la secuencia de aminoácidos 171-188, en el perfil de sedimentación de minicromosomas en gradiente lineal de sacarosa del 5 al 25 %. Carriles: A, Marcador de peso molecular; B, lisado total de cels. CV-1; C, núcleos; D, Sobrenadante de Varshavsky (minicromosomas totales); E, Precipitado de Varshavsky (cromatina celular); F, Pool 1; G, Pool 2; H, Pool 3; I, Pool 4; J, Pool 5.

12.- Perfil de Sedimentación de minicromosomas de SV-40 del ensayo +/- ARNasa A. Línea cortada, perfil de sedimentación de minicromosomas tratados con ARNasa A; Línea continua, perfil de sedimentación de minicromosomas no tratados.

13.- Inmunodetección de proteínas antigenicamente relacionadas con el producto del oncogene c-myc con el anticuerpo dirigido contra la secuencia de aminoácidos 171-188, en los diferentes Pools de ambos perfiles de

sedimentación de minicromosomas +/- ARNasa A. Carriles: A, B, C, D y E, Pools 1 a 5 sin ARNasa; Carriles: F, G, H, I y J, Pools 1 a 5 con ARNasa A.

14.- Inmunodetección de proteínas antigenicamente relacionadas con el producto del oncogene c-myc con el anticuerpo dirigido contra la secuencia de aminoácidos 43-55, en los diferentes Pools de ambos perfiles de sedimentación de minicromosomas +/- ARNasa A. Carriles: A, B, C, D y E, Pools 1 a 5 con ARNasa A; Carriles: F, G, H, I y J, Pools 1 a 5 sin ARNasa A.

15.- Metodología de inmunoprecipitación de Complejos Replicativos de SV-40, mediante la utilización de proteína p-32 del fago T4 y anticuerpos dirigidos contra esta.

16.- Perfil de sedimentación de minicromosomas de SV-40, con marcaje largo de ^{14}C -Timidina y un pulso de 5 minutos antes de la extracción con ^3H -Timidina. Circulos vacios, incorporación de ^3H -Timidina; Triangulos negros, incorporación de ^{14}C -Timidina. El Pulso de 5 minutos marca diferencialmente los minicromosomas activos en replicación.

17.- Perfil de sedimentación de minicromosomas de SV-40 tratados con proteína p-32 del fago T4 y anticuerpos dirigidos contra ésta, después de un marcaje largo de ^{14}C -Timidina y un pulso de 5 minutos antes de la extracción con ^3H -Timidina.

Línea cortada, incorporación de ^3H -Timidina; Línea continua, incorporación de ^{14}C -Timidina.

18.- Migración electroforética en gel de agarosa de varias fracciones del proceso de inmunoprecipitación de Complejos Replicativos de SV-40. Carriles: A, ADN de fago lambda digerido con la enzima de restricción Hind III; B, Minicromosomas totales; C, Núcleos totales; D, Complejos Replicativos (Fondo del Gradiente); E, Minicromosomas maduros (Fracción 15 del Gradiente).

19.- Autoradiografía de la migración electroforética en gel de agarosa, de varias fracciones del proceso de inmunoprecipitación de Complejos Replicativos de SV-40. Carriles: A, ADN de fago lambda digerido con la enzima de restricción Hind III; B, Minicromosomas totales; C, Nucleos totales; D, Complejos Replicativos (Fondo del gradiente); E, Minicromosomas maduros (Fracción 15 del gradiente).

20.- Inmunodetección de proteínas antígenicamente relacionadas con el producto del oncogene c-myc, en Complejos Replicativos y Minicromosomas maduros de SV-40, con los anticuerpos dirigidos contra las secuencias de aminoácidos 43-55 y 171-188. Carriles: A, Complejos Replicativos con anti c-myc 171-188; B, Minicromosomas maduros con anti c-myc 171-188; C, Complejos Replicativos con anti c-myc 43-55; D, Minicromosomas maduros con anti c-myc 43-55.

ABREVIATURAS

- ADN.- Acido Desoxiribonucléico.
ARN.- Acido Ribonucléico.
ARNasa A.- Ribonucleasa A.
cpm.- Cuentas por minuto.
ml.- Mililitro.
ul.- Microlitros.
ug.- Microgramos.
SDS.- Dodecyl Sulfato de Sodio.
¹⁴C.- Isotopo Carbono Catorce.
³H.- Isotopo Tritio.
EDTA.- Acido Etilendiaminotetracético.
PMSF.- Fenilmetilsulfonilfluoruro.
DTT.- Dithiothreitol.
APS.- Persulfato de Amonio.
Mr.- Masa Relativa de una molécula en daltones.
Kd.- Kilodaltones.
ufp.- Unidades formadoras de placa.
moi.- Multiplicidad de infección.
Ig.- Inmunoglobulinas.
TCA.- Acido Tricloroacético.
TEA.- Trietanolamina.
TEMED.- Trietilmetiletilendiamino.

Tris.- Tris(hidroximetil)aminometano.

POPOP.- p-bis 2(5-feniloxazolil) benzeno.

PPO.- 2,5-Difeniloxazol.

p32.- Proteína codificada por el gene 32 del fago T4.

PBS.- Amortiguador Salino de Fosfatos.

rpm.- Revoluciones por minuto.

ma.- Miliamperes.

M.- Unidad Molar.

pb.- Pares de bases.

Kpb.- 1000 pares de bases.

BIBLIOGRAFIA

1.- Abrams, H. D.; Rohrschneider, L. R.; Eisenman, R.N. (1982). Nuclear location of the putative transforming protein of myelocytomatosis virus. Cell 29:427-439.

2.- Alitalo, k.; Ramsay, G.; Bishop, J. M.; Pfeifer, S. O.; Colby, W. W.; Levinson, A. D. (1983). Identification of nuclear proteins encoded by viral and cellular myc oncogenes. Nature 306:274-277.

3.- Battey, J.; Moulding, C.; Taub, R.; et al. (1983). The human c-myc oncogene: Structural consequences of translocation into the IgH locus in Burkitt lymphoma. Cell 34:779-787.

4.- Banerji, J.; Puscioni, S.; Shaffner, W. (1981). Expression of a β -globin gene is enhanced by remote SV 40 DNA sequences. Cell 27:299-308.

5.- Benoist, C.; Chambon, P. (1981). In vivo sequence requirements of the SV 40 early promotor region. Nature 290:304-310.

6.- Bernard, O.; Cory, S.; Gerndakis, S.; Webb, E.; Adams, J. A. (1983). Sequence of the murine and human cellular myc oncogenes and two modes of myc transcription resulting from chromosome translocation in B-limphoid tumours. EMBO J. 2:2375-2383.

7.- Buckler-White, A.; Krauss, M.; Pigiet, V.; Benbow, R. (1982). Asynchronous bidirectional replication of polyoma virus DNA. *J. Virol.* 43:885-895.

8.- Burnette, W. N. (1981). :Western Blotting:: Electroforetic transfer of proteins from Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 112:195-203.

9.- Burton, K. (1956). A study of the conditions and mechanism of the Diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of Deoxyribonucleic Acid. *Biochem. J.* 62:315-322.

10.- Chan, S.; Evan, G.; Sikora, K. (1986). The detection of c-myc oncogene product in patients with solid tumours. *J. Tumoer Marker Onc.* 1(2):93-99.

11.- Colby, W.; Chen, E.; Smith, D.; Levinson, A. (1983). Identification and nucleotide sequence of a human locus homologous to the v-myc oncogene of avian myelocytomatosis virus MC29. *Nature* 301:722-725.

12.- Collet, M. S.; Erickson, R. L. (1978). Protein kinase activity associated with the avian sarcoma virus src gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:2021-2024.

13.- Comings, D. E. (1973). A general theory of carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70:3324-3328.

14.- Cooper, J. A.; Hunter, T. (1983). Regulation of cell growth and transformation of ttrosine-specific protein kinases:

the search for important cellular substrate proteins. *Curr. Top. Micro. Immun.* 107:125-161.

15.- Croce, C. M.; et al. (1983). Transcriptional activation of an unrearranged and untranslocated c-myc oncogene by translocation of a C locus in Burkitt lymphoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:6922-6926.

16.- Curran, T.; Miller, A.; Zokas, L.; Verma, I. M. (1984). Viral and cellular fos proteins: a comparative analysis. *Cell* 36:259-268.

17.- De-Baetselier, P.; et al. (1980). Differential expression of H-2 gene products in tumour cells is associated with their metastogenic properties. *Nature* 288:179-181.

18.- DePamphilis, M. L.; Wassarman, P. M. (1980). Replication of eukariotic chromosomes: a close-up of the replication fork. *Ann. Rev. Biochem.* 49:627-666.

19.- DePinho, R. A.; Legouy, E.; Feldman, L. B.; Kohl, N. E.; Yancopoulos, G. D.; Alt, F. W. (1986). Structure and expression of the murine N-myc gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83:1827-1831.

20.- Donner, P.; Greiser-Wilke, I.; Moelling, K. (1982). Nuclear localization and DNA binding of the transforming gene product of avian myelocytomatosis virus. *Nature* 296:262-266.

21.- Doolittle, R. F.; Hunkapiller, M. W.; Hood, L. E. et al. (1983). Simian sarcoma virus oncogene, v-sis, is derived from the gene (or genes) encoding a platelet-derived growth factor. *Science* 221:275-279.

22.- Downward, J.; Yarden, Y.; Mayes, E.; et al. (1984). Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature* 307:521-522.

23.- Dubochet, J.; Docommun, M.; Zollinger, M.; Kellenberg, E. (1971). A new preparation method for dark-field electron microscopy of biomacromolecules. *J. Ultrastructure Res.* 35:147-167.

24.- Evan, G.; Lewis, G.; Ramsay, G.; Bishop, M. (1985). Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol. Cell. Biol.* 5(12):3610-3616.

25.- Eisenman, R. N.; Tachibana, C. Y.; Abrams, H. D.; Hann, S. R. (1985). v-myc and the c-myc encoded proteins are associated with the nuclear matrix. *Mol. Cell. Biol.* 5:114-126.

26.- Elder, J.; Spritz, R.; Weissman, S. (1981). *Ann. Rev. Biochem.* 49:627-666.

27.- Feldman, N. T.; Nevins, J. R. (1983). Localization of the adenovirus E1A protein, a positive acting transcription factor, in infected cells. *Mol. Cell. Biol.* 3:829-838.

28.- Fernandez, R. M. (1983). Neoplasias en México. *Salud Pública de México, S.S.A.* 25:3.

29.- Fiers, W.; Contreras, R.; et al. (1978). Complete nucleotide sequence of SV40 DNA. *Nature* 273:113-120.

30.- García-Carrancá, A.; Miguel, F.; Damhus, M. E.; Gariglio, P. (1986). Structure of monkey kidney cell RNA polymerase II: characterization of RNA polymerase associated

with SV-40 late transcriptional complexes. Arch. Biochem. Biophys. 251(1):232-238.

31.- Gariglio, P.; Mousset, S. (1975). Isolation and partial characterization of a nuclear RNA polymerase-SV40 DNA complex. FEBS Lett. 56:149-155.

32.- Gariglio, P.; Llopis, R.; Oudet, P.; Chambon, P. (1979). The template of the isolated native simian virus 40 transcriptional complexes is a minichromosome. J. Mol. Biol. 131:75-101.

33.- Gazin, C.; Rigolet, M.; Briand, J. P.; Van Regenmortel, M. H.; Galibert, F. (1986). Immunochemical detection of proteins related to the human c-myc exon-I. EMBO J. 5(9):2241-2250.

34.- Giallongo, A.; Apella, E.; Richiardi, R.; Rovera, G.; Croce, C. (1983). Identification of the c-myc oncogene product in normal and malignant B cells. Science 222:430-432.

35.- Goodherman, K. (1982). Protein Blotting. En: Walker, J.; Gastra, W. (eds.). 1982. Techniques in Molecular Biology. Croom Helm LTD. Publ. Londres. (Preprint).

36.- Hann, S. R.; et al. (1983). Proteins encoded by v-myc and c-myc oncogenes: identification and localization in acute leukemia virus transformants and bursal lymphoma cell lines. Cell 34:789-798.

37.- Hann, S. R.; Eisenman, R. N. (1984). Proteins encoded by the human c-myc oncogene: differential expression in neoplastic cells. Mol. Cell. Biol. 4:2486-2497.

38.- Hayward, W.; Neel, B.; Astrin, S. (1981). Activation of a cellular onc gene by promoter insertion in ALV-induced lymphoid leukemia. Nature 290:475-480.

39.- Hirt, B. (1967). Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. J. Mol. Biol. 26:365-369.

40.- Hunter, T.; Stefton, B. M. (1980). Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77:1311-1314.

41.- Iguchi-Arigo, S. M. M.; Itani, T.; Kiji, Y.; Arigo, H. (1987). Possible function of the c-myc product: promotion of cellular DNA replication. EMBO J. 6(8):2365-2371.

42.- Jakobovits, A.; Schwab, M.; Bishop, J. M.; Martin, G. R. (1985). Expression of N-myc in teratocarcinoma stem cells and mouse embryos. Nature 318:188-191.

43.- Katzav, S.; et al. (1983). Alterations in major histocompatibility complex phenotypes of mouse cloned T 10 sarcoma cells: association with shifts from nonmetastatic to metastatic cells. J. Natl. Canc. Inst. 71:317-319.

44.- Kingston, R.; Baldwin, A.; Sharp, P. (1984). Regulation of heat shock protein 70 gene expression by c-myc. Nature 312:180-182.

45.- Knudson, A. G. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 68:820-823.

- 46.- Knudson, A. G.; Strong, L. C. (1972). Mutation and cancer: neuroblastoma and pheochromocytoma. *Am. J. Hum. Gen.* 24:514-518.
- 47.- Kohl, N. E.; Legouy, E.; DePinho, R.; Nisen, P. D.; et al. (1986). Human N-myc is closely related in organization and nucleotide sequence to c-myc. *Nature* 319:73-77.
- 48.- Krauss, M.; Gourlie, B. B.; Bayne, M. L.; Bainbow, R. M. (1984). Polyomavirus minichromosomes: associated DNA topoisomerase II and DNA ligase activities. *J. Virol.* 49:333-342.
- 49.- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- 50.- Lewton, B. A.; DeLucia, A.; Tegtmeyer, P. (1984). Binding of simian virus 40 A protein to DNA with deletions at the origin of replication. *J. Virol.* 49:9-13.
- 51.- Linial, M.; Groudine, M. (1985). Transcription of three c-myc exons is enhanced in chicken bursal lymphoma cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:53-57.
- 52.- Maniatis, T.; Fritsch, E. F.; Sambrook, J. (1982). *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory. New York.
- 53.- Marcu, H.; Harris, L.; Stanton, L.; Erickson, J.; Watt, R.; Croce, C. (1983). Transcriptionally active c-myc oncogene is contained within NIARD, a DNA sequence associated with chromosome translocations in B cell neoplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:519-524.

54.- Michitsch, R. W.; Melera, P. W. (1985). Nucleotide sequence of the 3' exon of the human N-myc gene. *Nucleic Acids Res.* 13:2545-2558.

55.- Moelling, K.; Sander, T.; Lorenz, U.; Beimling, P.; Bading, H. (1986). Interactions of the oncogene protein myc with specific DNA fragments. *J. Cancer Res. Clin. Onc.* 112:97-99.

56.- Murphree, A. L.; Benedict, W. F. (1984). Retinoblastoma: clues to human oncogenesis. *Science* 223:1028-1033.

57.- Nishikura, K.; Ar-Rushdi, A.; Erickson, J.; Watt, R.; Rovera, G.; Croce, C. (1983). Differential expression of the normal and of the translocated human c-myc oncogene in B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:4822-4826.

58.- Payne, G.; Bishop, J. M.; Varmus, H. (1982). Multiple arrangements of viral DNA and an activated host oncogene in bursal lymphomas. *Nature* 295:209-214.

59.- Panet, A.; Cedar, H. (1977). Selective degradation of integrated murine leukemia proviral DNA by deoxyribonucleases. *Cell* 11:933-940.

60.- Rabbitts, T. H.; Hamlyn, P. H.; Baer, R. (1983). Altered nucleotide sequence of a translocated c-myc gene in Burkitt lymphoma. *Nature* 306:760-765.

61.- Rio, D.; Robbin, A.; Myers, R.; Tijan, R. (1980). Regulation of simian virus 40 early transcription in vitro by a purified tumour antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77:5706-5710.

- 62.- Robertson, M. (1984). Progress in malignancy. Nature 309:512-513.
- 63.- Saito, H.; Hayday, A. C.; Wiman, K.; Hayward, W. S.; Tonegawa, S. (1983). Activation of the c-myc gene by translocation: a model for translational control. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:7476-7480.
- 64.- Sandersson, A. R.; Beverly, P. E. (1983). Interferon, -2 microglobulin and immunoselection in the pathway to malignancy. A blinkered view from Nag;s Head Yard. Imm. Today 4:211-213.
- 65.- Sarid, J.; Halazonetis, T. H.; Murphy, W.; Leder, P. (1987). Evolutionarily conserved regions of the human c-myc protein can be uncoupled from transforming activity. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:170-173.
- 66.- Shortle, D.; Nathans, D. (1979). Regulatory mutants of simian virus 40: constructed mutants with base substitutions at the origin of DNA replication. J. Mol. Biol. 131:801-817.
- 67.- Stanton, L. W.; Watt, R.; Marcu, K. B. (1983). Translocation breakage and truncated transcripts of c-myc oncogene in murine plasmacytomas. Nature 303:401-406.
- 68.- Stanton, L. W.; Schwab, M.; Bishop, J. M. (1986). Nucleotide sequence of the human N-myc gene. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83:1772-1776.
- 69.- Sweet, B.; Hilleman, M. (1960). The vacuolating virus S.V. 40. Proc. Soc. Exp. Med. 105:420-427.

- 70.- Tack, L.; Wassarman, P.; DePamphilis, M. (1981).
Chromatin assembly. Relationship of chromatin structure to DNA
sequence during simian virus 40 replication. J. Biol. Chem.
256:8821-8828.
- 71.- Taub, R.; Moulding, C.; Battey, J.; Murphy, W.; Leder,
P.; et al. (1984). Activation and somatic mutation of the
translocated c-myc gene in Burkitt lymphoma cells. Cell
36:339-348.
- 72.- Tegtmeier, P.; Lewton, B. A.; DeLucia, A.; Wilson, V.
G.; Ryder, K. (1983). Topography of simian virus 40 A
protein-DNA complexes: arrangement of protein bound to the origin
of replication. J. Virol. 46:151-161.
- 73.- Tolan, D. R.; Lambert, J. M.; Boileau, G.; Fanning, T.
G.; Kenny, J. W.; Vassos, A.; Traut, R. R. (1980).
Radioiodination of microgram quantities of ribosomal proteins
from polyacrilamide gels. Anal. Biochem. 103(1):101-109.
- 74.- Tooze, J. (1981). DNA Tumor Viruses. Ed. Cold Spring
Harbor laboratory. U.S.A.
- 75.- Towbin, H.; Staehglin, T.; Gordon, J. (1979).
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to
nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc.
Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76(9):4350-4355.
- 76.- Van Beneden, R. J.; Watson, D. K.; Chen, T. T.;
Lautenberger, J. A.; Papas, T. S. (1986). Cellular myc (c-myc)
in fish (rainbow trout): its relationship to other vertebrate myc

genes and to the transforming genes of the MC29 family of viruses. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83:3698-3702.

77.- Van Straaten, J. P.; Rabbits, T. H. (1987). The c-myc protein is associated with the nuclear matrix through specific metal interaction. Onc. Res. 1:221-228.

78.- Varmus, H. E. (1984). The molecular genetics of cellular oncogenes. Ann. Rev. Genet. 18:553-612.

79.- Varshavsky, A.; Sundin, O.; Bohn, M. (1978). SV40 viral minichromosome: preferential exposure of the origin of replication as probed by restriction endonucleases. Nucl. Acids Res. 5:3469-3478.

80.- Watson, D. K.; Psallidopoulos, M. C.; Samuel, K. P.; Dalla-Favera, R.; Papas, T. S. (1983). Nucleotide sequence analysis of human c-myc locus, chicken homologue, and myelocytomatosis virus MC29 transforming gene reveals a highly conserved gene product. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:3642-3645.

81.- Watt, R. A.; Shatzman, A. R.; Rosenberg, M. (1985). Expression and characterization of the human c-myc DNA-binding protein. Mol. Cell. Biol. 5:448-456.

82.- Watt, R. A.; Stanton, L.; Marcu, K. B.; Gallo, R. C.; Croce, C. M.; Rovera, G. (1983). Nucleotide sequence of cloned cDNA of human c-myc oncogene. Nature (London) 303:725-728.

83.- Waterfield, M. D. (1983). Platelet-derived growth factor is structurally related to the putative transforming protein p-28 sis of simian sarcoma virus. Nature 304:35-37.

- 84.- Weber, K.; Pringle, J. R.; Osborn, M. (1972).
Measurement of molecular weights by electrophoresis on
SDS-acrylamide gel. *Methods Enzymol.* 26(C):3-27.
- 85.- Wingvist, R.; Saksela, K.; Alitalo, K. (1984). The myc
proteins are not associated with chromatin in mitotic cells. *EMBO
J.* 3:2947-2950.
- 86.- Wray, W.; Boulikas, T.; Wray, V. P.; Hancock, R. (1981
) . Silver staining of proteins in polyacrilamide gels. *Anal.
Biochem.* 118(1):197-203.
- 87.- Zimmerman, K. A.; Yancopoulos, G. D.; Collum, R. G.;
Smith, R. K.; Kohl, N. E.; et al. (1986). Differential
expression of myc family genes during murine development. *Nature*
319:783-790.