

97
24

LA ESPECIFICIDAD ENZIMATICA DE LAS POLIMERASAS
CELULARES Y VIRALES

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE BIOLOGO PRESENTA
GRECO, HERNANDEZ RAMIREZ

Facultad de Ciencias, U.N.A.M.

México, D.F.

Febrero de 1992.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RESUMEN

Aunque se ha sugerido que las vías metabólicas surgieron por una evolución en regresión, se cree que las células ancestrales que ya poseían síntesis de proteínas y DNA, más bien poseían familias de enzimas poco específicas y sin regulación que realizaban clases de reacciones, participando en varias secuencias de reacciones a la vez. Esta hipótesis se ve apoyada porque se conocen casos de enzimas que pertenecen a rutas metabólicas distintas y muy antiguas son homólogas entre sí. Además, se sabe que vías metabólicas muy antiguas poseen enzimas que son flexibles enzimáticamente.

En este trabajo se discuten las evidencias que sugieren que las polimerasas, que son de las primeras enzimas que tuvieron que surgir en la biósfera, son muy flexibles intrínsecamente en cuanto al molde y sustrato sobre los que actúan.

Para ello se hicieron experimentos con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli*, con el fin de evaluar su especificidad enzimática para aceptar ribo- y desoxirribonucleótidos como sustrato.

Los resultados que se obtuvieron en esta tesis, así como el análisis teórico de la bioquímica de las polimerasas actuales, nos permiten apoyar la idea de que las primeras enzimas eran poco específicas. Se discute también la posibilidad de que la evolución de las polimerasas en particular se debió sobre todo a la posterior adición de subunidades reguladoras a los péptidos catalíticos ancestrales poco específicos.

I.	Introducción.....	1
II.	La especificidad enzimática en las células actuales.....	13
	La especificidad enzimática de las polimerasas.....	23
III.	Material y métodos.....	25
IV.	Resultados.....	27
V.	La evolución del replisoma.....	37
VI.	Discusión y conclusión.....	39
VII.	Referencias.....	44

1. INTRODUCCION

A partir del descubrimiento de la actividad catalítica de las moléculas de RNA (Kruger et al., 1982; Guerrier-Takada et al., 1983), Alberts (1986), Gilbert (1986) y Lazcano (1986) sugirieron que tanto la síntesis de proteínas como el DNA evolucionaron durante el Arqueano temprano en el seno de poblaciones celulares cuyo metabolismo estaba basado en RNA. De acuerdo con esta hipótesis, el DNA y la síntesis de proteínas aparecieron en estas células como producto de la evolución biológica, y no como resultado de los procesos de evolución prebiótica. Las evidencias experimentales y teóricas de que la evolución celular pudo haber seguido este curso han sido discutidas en los trabajos de Crick (1968), Orgel (1968, 1987), Alberts (1986), Gilbert (1986), Lazcano (1986, 1992) y Lazcano et al. (1988a, 1988b, 1992c). Gilbert (1986) llamó esta etapa de la evolución celular El Mundo del RNA.

Si el RNA era la molécula portadora de la información genética y la responsable de la catálisis antes del surgimiento de las proteínas y del DNA, la aparición de un polipéptido que le ayudara a catalizar su replicación, por sí mismo primero y, después, que lo replicara más eficientemente (una RNA polimerasa RNA-dependiente, o RNA replicasa), hubiera sido rápidamente seleccionado a favor. Así, las RNA replicasas deben ser una de las enzimas que primero aparecieron en la biósfera, a partir de las cuales todas las polimerasas actuales evolucionaron. Esto es, las polimerasas, y en particular los componentes catalíticos de las RNA polimerasas celulares, son de las enzimas más antiguas que existen en la biósfera, y descienden de las RNA replicasas ancestrales (Lazcano 1986; Lazcano et al., 1988b, 1990, 1992a; Llaca et al., 1990).

Así pues, el estudio de las polimerasas representa una importante posibilidad para intentar comprender cuál era el funcionamiento e identidad metabólica de las células que ya poseían síntesis de proteínas, así como para entender los mecanismos de la evolución temprana del metabolismo en general.

En un intento de explicar la forma en la que se originaron las primeras rutas metabólicas en la evolución temprana de la vida, Norman H. Horowitz propuso en 1945 que las vías biosintéticas evolucionaron en reversa; según esta hipótesis, las enzimas que participan en una cadena de reacciones de una vía metabólica dada fueron apareciendo paso a paso, pero en el orden inverso en el que la síntesis procede; esto es, el último paso en la cadena fue el primero en aparecer en el curso de la evolución, en segundo lugar aparecería el penúltimo paso, y así sucesivamente.

Como afirmó el mismo Horowitz (1945): "una ruta metabólica sólo tiene valor adaptativo cuando se considera como un todo, ya que, por lo general, sólo el producto final de la vía de síntesis es útil. Los estados intermedios en la

síntesis de un aminoácido no tienen valor per se, y los genes correspondientes podrían perderse dado que las enzimas que codifican no tendrían utilidad alguna en el momento de su aparición evolutiva".

Horowitz (1945) propuso que las células primitivas tomaban los metabolitos necesarios para su existencia directamente del caldo primigenio en donde se habían acumulado por los procesos de evolución prebiótica. Las células los usaban produciendo una enzima capaz de utilizar específicamente una molécula dada. Una vez que dicho metabolito se agotaba del medio ambiente, debido a la demanda de la población celular primigenia o a su degradación química, la duplicación y posterior divergencia del gen de la primer enzima llevaba a la aparición de una nueva enzima que a su vez era capaz de utilizar la molécula precursora del primer metabolito. Una vez agotada ésta, el mismo mecanismo permitía el surgimiento de otra enzima que utilizaría ahora el siguiente precursor, y así sucesivamente hasta quedar ensamblada toda la vía metabólica de ese metabolito en particular, quedando todos los genes de la nueva vía agrupados.

Así, según Horowitz (1965), "al evolucionar hacia atrás las vías metabólicas, cada mutación podría así conferir una ventaja selectiva a su poseedor, dado que de este modo podría hacerse disponible un nuevo suministro del producto final".

Tanto la existencia de los operones, propuestos teóricamente a principios de los sesenta por François Jacob y Jaques Monod para el sistema lac (Jaçob y Monod, 1961), como las primeras observaciones de que en *Salmonella* y *Escherichia coli* los genes involucrados en la biosíntesis de la histidina, leucina y triptofano, respectivamente, están colocados muy cercanamente en el cromosoma (Demerec y Hartman, 1959), fueron tomadas por Horowitz en una segunda revisión de su hipótesis, como evidencia de que la aparición de las rutas biosintéticas había sido "hacia atrás" (Horowitz, 1965).

"Ningún gen involucrado en la biosíntesis de la histidina está afuera del cúmulo, y ningún gen que no tenga que ver con su síntesis está dentro de éste. Las enzimas de un operón forman una reacción en cadena, donde el producto de una reacción es el sustrato de la siguiente. Esto implica solapamiento de especificidades, lo que a su vez sugiere homología estructural y un origen común" (Horowitz, 1965).

Por otra parte, al estudiar el mismo problema, S. Waley en 1969 observó que existen varios ejemplos de enzimas que pertenecen a diferentes vías metabólicas y que, sin embargo, pueden realizar la misma reacción catalítica sobre el mismo sustrato, aunque con poca eficiencia. Ello ocurre con el p-nitrofenil acetato, cuya hidrólisis la pueden llevar a cabo la anhidrasa carbónica, la gliceraldehído fosfato deshidrogenasa y la quimiotripsina. A su vez, Waley se percató de que una sola enzima, como la lisozima, puede realizar su reacción sobre varios sustratos parecidos (en

este caso ésteres), funcionando como una glicerohidrolasa general (Waley, 1969).

A partir de este solapamiento tanto en las especificidades como en los tipos de reacciones que poseen algunas enzimas actuales, Waley (1969) propuso que las enzimas contemporáneas descienden de formas menos específicas que las actuales en cuanto a la aceptación del sustrato.

A partir del conocimiento sobre la evolución de las globinas, Waley (1969) concluyó acertadamente que lo que tiende a preservarse es la conformación tridimensional de las proteínas, y con ella el tipo de reacción catalítica. Así, según Waley (1969), lo que evolutivamente cambia con mayor frecuencia en las enzimas es la especificidad por el sustrato, mientras que el tipo de reacción que realizan tiende a conservarse más.

Al comparar su hipótesis con las ideas de Horowitz, Waley concluyó que durante la evolución de una ruta metabólica entera, su ensamblaje sí pudo haberse producido paso a paso "hacia atrás", reclutando enzimas de las que se hallaban ya presentes en la célula; sin embargo, él pensaba que la evolución de cada enzima en particular partió de enzimas originales poco específicas, hacia sus formas con rangos de aceptación de sustratos cada vez más estrechos.

De esta manera, la formación de cada nueva enzima no se habría dado por los procesos de duplicación genética y posterior divergencia, por mutación, de la última enzima de la vía como lo propuso Horowitz, sino que las enzimas que iban añadiendo cada vez un paso más a la vía podrían provenir de enzimas muy antiguas y poco específicas presentes en la célula.

En resumen: para Waley (1969), las rutas metabólicas si se fueron formando "paso a paso" hacia atrás, pero la evolución de cada enzima fue hacia formas cada vez más específicas.

Posteriormente, M. Yčas (1974), C. Blake (1974) y R. Jensen (1976; 1985), de manera comparable a Waley (1969), propusieron que en un principio las células poseían tan sólo unos cuantos genes que codificaban para pocas enzimas, y que aunque éstas realizaban un evento catalítico particular (fosforilación, deshidrogenación, etc.), podían aceptar como sustrato una amplia gama de moléculas parecidas. Es decir, las enzimas primigenias poseían poca especificidad por el sustrato sobre el cual actuaban. Así, las primeras células tenían metabolismos basados en enzimas muy flexibles enzimáticamente que realizaban clases o tipos de reacciones.

Con respecto a la teoría de Horowitz (1945, 1965) se hacen evidentes las siguientes dificultades para concebir que el tipo de proceso que él propuso (1945, 1965) efectivamente se haya llevado a cabo en la evolución de todas las vías metabólicas: un número grande de intermediarios metabólicos son muy inestables dentro de la célula, y lo son todavía más fuera de ella. Muchos otros tienen una vida media muy corta, y por lo tanto es muy

difícil pensar que por procesos de duplicación genética y divergencia por mutación, que requirieren escalas de tiempo a nivel geológico, aparezca una enzima nueva que eventualmente los pudiese hacer aprovechables.

Otra dificultad con la hipótesis de Horowitz surge cuando se piensa que muy probablemente las células primigenias poseían mecanismos de transporte muy ineficientes y poco selectivos, por lo que les era de gran dificultad exportar desde el medio extracelular hasta el interior de la célula los compuestos útiles, sobre todo aquellos que por su inestabilidad química se hallaban en muy bajas concentraciones en el medio (Yças, 1974; Jensen 1976, 1985; Clarke, 1981, 1983).

La hipótesis de Horowitz (1945, 1965) propone que las enzimas de las rutas biosintéticas son homólogas y deben mostrar similitudes estructurales entre sí, ya que habrían aparecido por duplicaciones consecutivas de un gen ancestral. Sin embargo, las subunidades α y β de la triptofano sintetasa de *E. coli*, cuyos genes se encuentran en el mismo operón, no muestran similitudes en secuencia (Yanofsky, 1984). Por el contrario, la cadena β de la triptofano sintetasa de *E. coli*, *S. typhimurium*, y *B. subtilis* son homólogas a la treonina sintetasa, como lo revelan los estudios de sus secuencias (Parsot, 1987).

El arreglo en operones, y éstos en cúmulos o regulones, tiene más bien un papel netamente regulatorio y su presencia, estructura y regulación depende del nicho que explota una especie bacteriana, y no son el resultado del arreglo original de la manera en que se originaron las vías metabólicas. Aparentemente, para vías biosintéticas el operón es resultado de un proceso muy temprano (filogenéticamente) de rearreglos y movimientos de genes en el genóforo (Lazcano et al., 1992c).

Por ejemplo, mientras que en *E. coli* la mayoría de los genes involucrados en rutas tanto catabólicas como anabólicas se encuentran en operones, en *Pseudomonas* la regla general es que sólo los genes involucrados en rutas anabólicas son los que se hallan en operones, mientras que los genes de la mayoría de las rutas degradativas se hallan dispersos en el genoma (Holloway y Morgan, 1986); incluso, los genes de las rutas catabólicas se hallan localizados en distintos lugares en las diferentes especies de este mismo género, lo que puede estar reflejando que tengan un origen independiente a partir de elementos extracromosomales. Esta idea se ve apoyada porque a menudo las funciones catabólicas en *Pseudomonas* están localizadas en plásmidos, y estos genes pueden en alguna ocasión ser transferidos hacia el cromosoma (Krawiec y Riley, 1990). Este hecho apoya fuertemente las ideas de que se puede ensamblar una ruta metabólica nueva por el "reclutamiento" de enzimas ya existentes, como lo propone Waley (1969) y Jensen (1976).

Por otro lado, la adopción de un control negativo o positivo para una misma ruta difiere entre distintas especies bacterianas. Por ejemplo, los genes para la

utilización del glicerol están regulados negativamente en *E. coli*, positivamente en *Bacillus subtilis*, y sujetos a control negativo y positivo a la vez en *Streptomyces coelicolor* (Smith y Chater, 1987), y en las tres especies la proteína reguladora es distinta. Esto indica que dichos mecanismos reguladores son de origen polifilético.

El cAMP en *E. coli* es un regulador alostérico positivo para la utilización de las fuentes de carbono. Sin embargo, este metabolito no tiene esa función reguladora en otras especies, ya que sus niveles son siempre muy bajos en *B. subtilis*, o se mantienen constantes a pesar de las variaciones en las fuentes de carbón en *S. coelicolor* (Chater y Hopwood, 1989).

Por último, los genes para las mismas enzimas de una ruta particular se pueden encontrar en operones y corregulados en una especie, o dispersos en el genoma y expresados individualmente en otra. Parsot (1986) ha mostrado que en bacterias Gram positivas la vía de síntesis de la L-isoleucina a partir del A-cetobutirato participan cuatro enzimas. Pero si la primera enzima empieza con el piruvato como sustrato inicial, las mismas cuatro enzimas producen la L-valina al final de la vía, lo que nos habla de que estas enzimas no están reguladas en un mismo operón, ya que están participando en vías paralelas de síntesis. Asimismo, los genes *thrC* y *thrB*, que codifican para la treonina sintetasa y para la homoserina cinasa respectivamente, enzimas que participan en la vía de síntesis de la L-treonina, se encuentran en el operón *thr* tanto en *E. coli* como en *B. subtilis*. Sin embargo, en *B. subtilis* el orden de su organización es *thrC-thrB*, mientras que en *E. coli* el orden es *thrB-thrC*, lo que indica posiblemente que la construcción del operón fue independiente en ambas especies (Parsot, 1986). Dado que estos dos genes son homólogos entre sí (Parsot, 1986), antes de la divergencia de estas dos especies tuvo que existir un gen ancestral que se duplicó para dar origen a las dos enzimas. Es decir, el organismo ancestral a estas dos especies ya poseía ambas enzimas, pero éstas no estaban organizadas ni reguladas en un operón.

Se sabe que en *Streptomyces* sp. los genes para la utilización del glicerol se encuentran en un operón, mientras que en *E. coli* se encuentran dispersos, y en *B. subtilis* están agrupados pero no se cotranscriben (Chater y Hopwood, 1989).

Así, la regla parece ser que los genes para las funciones particulares de cada especie, es decir, los que definen el nicho o el ambiente que explota una especie bacteriana, son los que se encuentran en operones, regulones y en unidades policistrónicas; a su vez, los operones que usualmente se mantienen encendidos en una especie debido a su nicho se regulan positivamente, mientras que los que no se expresan por muchas generaciones están controlados negativamente (Chater y Hopwood, 1989).

Estas evidencias apuntan claramente que la aparición evolutiva de operones y regulones, así como su estructura, tuvo un valor adaptativo regulatorio en cada especie en particular, y su aparición sólo se pudo ir dando con el surgimiento más tardío de mecanismos de regulación enzimática y genética muy finos. Estos mecanismos de regulación incluyen: a) la presencia de operadores, b) secuencias de reconocimiento para proteínas reguladoras, c) proteínas alostéricas tanto represoras como activadoras, y d) complejos proteínicos receptores que reconocen a la vez los niveles de múltiples efectores metabólicos, con capacidad de sufrir distintas transiciones conformacionales moleculares alternativas (y por lo tanto catalíticas), y dar una respuesta catalítica integradora final. La aparición de los diferentes elementos genéticos y enzimáticos necesarios para controlar la expresión de un operón o un regulón, por lo tanto, sólo se puede entender en términos adaptativos de regulación, y según el ambiente que explota cada especie que los posea.

Como veremos más adelante, las polimerasas celulares y virales actuales son muy flexibles en cuanto al molde, sustrato y cofactor que pueden utilizar para llevar a cabo un mismo tipo o clase de evento catalítico (la formación de enlaces fosfoéster). Ello sugiere que podemos ver parte de su evolución a la luz de la teoría de Waley (1969), Yčas (1974) y Jensen (1976), discutida arriba. De acuerdo con este punto de vista, su gran flexibilidad enzimática es un remanente histórico del estado evolutivo del metabolismo en el que aparecieron.

Si las polimerasas celulares y virales actuales descienden de una polimerasa ancestral muy antigua, que se originó en el mundo del RNA y era parte de los primeros sistemas metabólicos en donde las enzimas eran poco específicas (Lazcano et al., 1992b), el análisis teórico y experimental de su especificidad en cuanto al molde, cofactor y sustratos que utilizan puede indicar cómo pudo haber sido la evolución de los metabolismos en sus etapas más tempranas.

Por ello, en este trabajo se hará un análisis de las evidencias que apoyan la hipótesis de que las polimerasas actuales son muy flexibles enzimáticamente. A su vez, ello nos permitirá apoyar la idea de que las primeras células poseían metabolismos basados en enzimas con amplios rangos de aceptación de sustratos y cofactores.

Tanto los resultados en torno al tipo de actividad catalítica que presentan las diferentes polimerasas celulares y virales reportados en la literatura (Tablas 1-4), como los que se obtuvieron en este trabajo al analizar la especificidad del fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* por su sustrato, demuestran que las polimerasas actuales poseen una flexibilidad considerable, lo que a su permite vez explicar los resultados "anómalos" reportados en la literatura en cuanto a la actividad de las diferentes polimerasas tanto in vivo como in vitro. Dicho análisis

evolutivo también nos permitirá discutir cómo pudo haber sido la transición en el Arqueano temprano de los genomas de RNA a los genomas de DNA que actualmente vemos en todas las células, transición que se dio en paralelo a la evolución del replisoma, complejo enzimático que sintetiza el genoma.

11. La especificidad enzimática en las células actuales

A pesar del arraigo que tiene la idea de que todas las enzimas son catalizadores que poseen una muy alta especificidad tanto por el sustrato sobre el que actúan como por sus cofactores, existen muchos ejemplos de enzimas que pertenecen a distintas rutas metabólicas que pueden sin embargo, realizar su actividad catalítica sobre sustratos diferentes, así como de que distintas rutas metabólicas se han ensamblado a partir del reclutamiento de enzimas comunes ya existentes (cuyo origen común nos lo indica su gran similitud en secuencia y actividad catalítica); es decir, enzimas que catalizan el mismo tipo de reacción química, pero que utilizan como sustrato diferentes moléculas, según la vía metabólica en la que estén funcionando.

Por ejemplo, las enzimas de las vías de síntesis de la valina, el triptófano, la treonina y la isoleucina muestran tanto sobrelapamiento de especificidad en sustratos, como semejanzas en secuencia y en los eventos catalíticos que realizan (Parsot, 1986, 1987). En *Pseudomonas* sp., el catabolismo de los compuestos aromáticos comienza con su utilización por enzimas con baja especificidad, para así poder aceptar la gran variedad de moléculas de este tipo que existen en la naturaleza. Todas las reacciones iniciales llevan a la formación de intermediarios aromáticos dihidroxilados, generalmente el catecol, ya que la subsecuente degradación por desestabilización de la estructura resonante estable del anillo aromático se facilita de esta manera. Esto es, todos los sustratos iniciales estructuralmente diferentes se canalizan hacia una sola ruta central por medio de pocas enzimas iniciales poco específicas y muy similares (Harayama y Timmis, 1989).

Como apoyo a la teoría de Waley (1969), Yčas (1974) y Jensen (1976), se sabe que algunas de las rutas metabólicas centrales, y posiblemente las más antiguas, poseen enzimas que son flexibles en cuanto al sustrato y cofactor que utilizan: Clarke (1981, 1983) y Mortlock (1976) revisan los cambios de especificidad de las enzimas que pertenecen a las rutas metabólicas de los azúcares; Waley (1969) muestra ejemplos de traslapamientos en las especificidades de las enzimas de la glicólisis y de algunas cinasas y fosforilasas; Jensen (1976, 1985), Jensen y Byng (1982), Yčas (1974), y Parsot (1986, 1987), analizan las similitudes en cuanto a tipos de reacción química, traslapamiento de aceptación de sustratos y similitud en secuencia de las enzimas que participan en la biosíntesis de los diferentes aminoácidos. Thelander y Reichard (1979), Kornberg (1980),

Holmgren (1981) y Cory (1988) han obtenido ejemplos de análogos de nucleótido trifosfatos que la ribonucleótido reductasa (una enzima central en la síntesis del DNA) puede aceptar como sustrato. En este trabajo se revisa lo propio para las polimerasas, involucradas en la síntesis de los ácidos nucleicos.

Lazcano et al. (1992b) hicieron un análisis de algunos de estos ejemplos y menciona su importancia evolutiva en el sentido de ir reconociendo la identidad metabólica del progenote, en los primeros estadios que siguieron a las células cuando los metabolismos estaban basados principalmente en moléculas de RNA, y que ya poseían síntesis de proteínas. Asimismo, el estudio de genes parálogos como los factores de elongación y las ATPasas que se encuentran tanto en arqueobacterias como en eubacterias y eucariontes (Lazcano et al., 1992b) ha permitido reconocer qué funciones metabólicas tenían las células en dicha etapa evolutiva.

De hecho, se puede suponer que tanto la ambigüedad en los productos de las reacciones, como la baja especificidad de las enzimas primigenias, producirían una traducción, también errónea y ambigua de los genes originales (Waley, 1969; Yčas, 1974; Woese, 1983). Así, cada cistrón pudo haber producido una familia de enzimas parecidas en secuencia y capacidades catalíticas, secuencias que variaban en torno a una secuencia consenso, equivalentes a las "cuasiespecie" virales discutidas por Domingo et al. (1985).

La especificidad enzimática de las polimerasas actuales.

Existen muchos estudios sobre la caracterización de la actividad catalítica de las diferentes polimerasas actuales. La gran mayoría de estos reportes no son explícitos en cuanto a que las polimerasas que estudian, cambian de especificidad, ni son discutidos e interpretados bajo la perspectiva evolutiva sobre la actividad catalítica que presentan las diferentes polimerasas celulares y virales. Sin embargo, dichos reportes nos dan distintos tipos de evidencias de que estas enzimas actualmente son capaces de aceptar una gama considerable de sustratos, moldes y cofactores al realizar su función enzimática.

Por una parte, existen numerosos estudios sobre la capacidad que tienen estas enzimas para utilizar tanto moléculas análogas de DNA y RNA como molde (como poli rCm, poli mG, poli I; Krakow y Ochoa, 1963; Gerard et al., 1974, y Kornberg, 1980), como para catalizar la incorporación, tanto in vivo como in vitro, de análogos de nucleótidos (por ejemplo, el bromouracilo, el bromodesoxiuracilo, la tiburcidina, la formicina, y los 2',3'-didesoxirribonucleótidos) durante la síntesis de DNA y RNA (Walker y DeClercq, 1979; Kornberg, 1980; Kunz, 1982).

Por otro lado, existen evidencias de la capacidad de las distintas polimerasas de alternar su función particular

dada, y de que pueden realizar la catálisis que normalmente asignamos a otra polimerasa; es decir, que una misma polimerasa puede aceptar diferentes moldes de RNA y DNA, diferentes cofactores, y ribo y/o desoxirribonucleótidos como sustratos.

Este último caso no se refiere a moléculas análogas del DNA o del RNA, ni a los análogos de los nucleótidos o desoxirribonucleótidos mencionados en el primer caso, sino a los nucleótidos y desoxirribonucleótidos "convencionales" y a sus polímeros, es decir, al DNA y RNA.

Es bien conocida la existencia de polimerasas que cambian de especificidad in vitro en condiciones naturales de ensayo. Es decir, existen polimerasas que modifican su especificidad sin cambiar ningún componente fisicoquímico durante el ensayo de actividad enzimática (Tabla 1), así como de otras que modifican su especificidad cuando sufren la sustitución del cofactor en las condiciones de ensayo in vitro (generalmente sustituyendo Mg^{++} por Mn^{++} , o alterando la fuerza iónica) (Tabla 2).

A su vez, existen varios reportes de polimerasas que pueden sintetizar cadenas de ácidos nucleicos formadas por ribonucleótidos (rNTPs) y desoxirribonucleótidos (dNTPs) a la vez, in vivo o in vitro, lo que da lugar a cadenas mixtas de rNTPs-dNTPs unidos covalentemente (Tabla 3). También se han reportado casos de incorporación in vivo de ribonucleótidos durante la síntesis de las cadenas de DNA genómico de diferentes entidades biológicas, así como de la polimerización "anómala", también in vivo, por distintas polimerasas celulares, de hebras de RNA en distintas células (Tabla 4). Ello indica que dichas polimerasas presentan una especificidad alterada in vivo.

Por otro lado, hay estudios que sugieren que algunas polimerasas celulares modifican su especificidad al replicar genomas de entidades genéticas foráneas, aunque se ignora el mecanismo involucrado en este proceso. Los siguientes estudios indican este último caso, en el que las polimerasas cambian in vivo de especificidad.

El RNA unicatenario del virus Delta de la hepatitis B es replicado por la célula que infecta. Según Taylor (1990), este proceso es mediado por una RNA polimerasa DNA-dependiente celular, mientras que Symons (1989) ha sugerido la existencia de una RNA replicasa celular aún desconocida.

Los estudios de Mülbach y Sanger (1979) con el viroide CPFV (viroide de la palidez del pepino) en protoplastos de hojas de tomate infectadas por este replicón, y de Yoshikawa y Takahashi (1986), con el HSV (viroide del impedimento del crecimiento del lúpulo), demostraron que la Á-amanitina inhibe la replicación de dichos viroides, y es bien sabido que este compuesto, en bajas concentraciones, inhibe específicamente a las RNA polimerasas DNA-dependientes II y III de eucariotes, pero no a la RNA polimerasa I (Lindell et al., 1970; Zylber y Penman, 1971; Weinman y Roeder, 1974; Wieland y Faulstich, 1978).

TABLA 1. Enzimas que cambian de especificidad in vitro en condiciones naturales de ensayo.

ENZIMA	FUNCION ALTERNA	REFERENCIA
DNA polimerasa I de <i>E. coli</i>	Reverso transcriptasa	Karkas et al., 1972. Mizutani y Temin, 1976.
DNA polimerasa 6S de <i>Vinca rosea</i>	Reverso transcriptasa	Gardner y Kado, 1976.
DNA polimerasa de <i>Ustilago maydis</i>	Reverso transcriptasa	Banks et al, 1976.
DNA polimerasa A de timo de ternera	Reverso transcriptasa	Steinhilber y Cummings, 1986. 1977.
DNA polimerasa β de HeLa, hígado de rata, timo de ternera, céls. KB humanas, embrión de pollo.	Reverso transcriptasa	(cf.) Weissbach, 1977.
DNA polimerasa gama humana de germen de trigo	Reverso transcriptasa	(cf.) Weissbach, 1977. Torrágó-Litvak et al., 1975.
DNA polimerasa III de <i>E. coli</i>	RNA polimerasa	McMacken y Kornberg 1978.
DNA polimerasa codificada por el plásmido mitocondrial LaBelle, de <i>Neurospora intermedia</i>	RNA polimerasa	Schulte y Lambowitz, 1991.
DNA polimerasa mitocondrial de <i>Neurospora intermedia</i>	Reverso transcriptasa	Schulte y Lambowitz, 1991.
Fragmento Klenow	RNA polimerasa	Este trabajo
RNA polimerasa de <i>E. coli</i>	RNA replicasa	Gomatos et al., 1964.
RNA polimerasa de <i>Micrococcus luteus</i>	RNA replicasa	Fox et al., 1964. Adam y Grossman, 1965.
RNA polimerasa II	RNA replicasa	Mülbach y Sanger,

de tomate

1979.

RNA polimerasa
del germen de trigo

RNA replicasa

Goodman et al.,
1984.

RNA polimerasa
del fago T7

RNA replicasa

Konarska y Sharp,
1989;
Konarska y Sharp,
1990.

TABLA 2. Modificación de la especificidad de polimerasas, in vitro, por cambio del cofactor.

FUENTE	ENZIMA	FUNCIONA COMO	COFACTOR USADO O CAMBIADO	REFERENCIA
HeLa	"R-DNA polimerasa I"	Reverso transcriptasa	Mn ⁺⁺	Friedlender et al., 1972.
HeLa	"R-DNA polimerasa II"	Reverso transcriptasa	Mn ⁺⁺	Friedlender et al., 1972.
HeLa	"R-DNA" polimerasa	Reverso transcriptasa	Mg ⁺⁺ por Mn ⁺⁺	Bolden et al., 1972.
Xenopus laevis	"R-DNA" polimerasa	Reverso transcriptasa	Mg ⁺⁺ por Mn ⁺⁺	Bolden et al., 1972.
Embrión de pollo	"R-DNA" polimerasa	Reverso transcriptasa	Mg ⁺⁺ por Mn ⁺⁺	Bolden et al., 1972.
Hígado de rata	"R-DNA" polimerasa	Reverso transcriptasa	Mg ⁺⁺ por Mn ⁺⁺	Bolden et al., 1972.
Bazo de rata	"R-DNA" polimerasa	Reverso transcriptasa	Mg ⁺⁺ por Mn ⁺⁺	Bolden et al., 1972.
Murino	"R-DNA" polimerasa	Reverso transcriptasa	Mg ⁺⁺ por Mn ⁺⁺	Bolden et al., 1972.
Linfocitos humanos	"R-DNA" polimerasa	Reverso transcriptasa	Mg ⁺⁺ por Mn ⁺⁺	Bolden et al., 1972.
HeLa, nuclear	"R-DNA" polimerasa	Reverso transcriptasa	Mn ⁺⁺	Spadari y Weissbach, 1974.
HeLa, cito-plásmica	"R-DNA" polimerasa	Reverso transcriptasa	Mn ⁺⁺	Spadari y Weissbach, 1974.
HeLa, nuclear	DNA polimerasa a ("R-DNA polimerasa)	Reverso transcriptasa	Mn ⁺⁺	Gerard, 1975.
HeLa, cito-plásmica	DNA polimerasa a ("R-DNA polimerasa)	Reverso transcriptasa	Mn ⁺⁺	Gerard, 1975.
Vinca rosea	DNA polimerasa 6S	Reverso transcriptas	Mn ⁺⁺ , Mn ⁺⁺ y Mg ⁺⁺	Gardner y Kado, 1976
Embrión de pollo	"RNA-dep. DNA polimerasa"	Reverso transcriptasa	Mg ⁺⁺ (con Mn ⁺⁺ funciona poco)	Bauer y Hofschneider, 1976.

Azotobacter vinelandii	RNA polimerasa	RNA replicasa	Mn++ y Mg++	Krakow y Ochoa, 1963.
M. luteus	RNA polimerasa	RNA replicasa	Mn++ Mn++ Mn++ Mn++	Nakamoto y Weiss, 1962. Fox et al., 1964. Haselkorn y Fox, 1965. Straat et al, 1971.
E. coli	RNA polimerasa	RNA replicasa	Mn++ Mn++ y Mg++ Mg++ por Mn++ Mg++ por Mn++ ó Zn++	Gomatos et al., 1964. Biebricher y Orgel, 1973. Llaca, et al., 1990.
Testiculos de rata	RNA polimerasa	RNA replicasa	Mn++	Ballard y William-Ashman, 1965.
Gérmen de trigo	RNA polimerasa II	RNA replicasa	Mg++ y Mn++	Rackwitz et al., 1981.
Lycopersicon peruvianum	RNA polimerasa III	RNA replicasa	Mg++ y Mn++	Rackwitz et al., 1981.
E. coli	DNA polimerasa I	Reverso transcriptasa	Mn++ por Mg++ Mn++ Mg++ por Mn++ Mg++ (en condiciones de ensayo para RT) Mn++	Stavrianopoulos et al., 1971. Karkas et al., 1972. Karkas, 1973. Karkas, 1973. Mizutani y Temin, 1976.
Médula ósea de conejo	DNA polimerasa 40-50 kD	Reverso transcriptasa	Mn++	Chang y Bollum, 1972.
HeLa	DNA polimerasa I	Reverso transcriptasa	Mn++ Mn++	Friedlender et al., 1972. Spadari y Weissbach, 1974.
Timo de ternera, nuclear	DNA polimerasa "3.39 S" (II ?)	Reverso transcriptasa	Mn++	Chang, 1973.

Dictyostelium discoideum	DNA polimerasa	Reverso transcriptasa	Mg++ por Mn++	Loomis et al., 1976.
HeLa	DNA polimerasa II	Reverso transcriptasa	Mn++	Friedlander et al., 1972.
Linfocitos humanos	DNA polimerasa II	Reverso transcriptasa	Mn++	Lewis et al., 1974.
Timo de ternera, nuclear	DNA polimerasa "3.39 S" (II ?)	Reverso transcriptasa	Mn++, Mg++	Bekkering-Kuylaars y Campagnari, 1974.
Nuclear, timo de ternera	DNA polimerasa de 73 kD.	Reverso transcriptasa	Mn++, Mg++	Bekkering-Kuylaar y Campagnari, 1974.
Pollo	DNA polimerasa III	Reverso transcriptasa	Mn++, Mg++ y Mn++	Stavrianopoulos et al., 1971.
Pollo	DNA polimerasa III	RNA Polimerasa	Mg++	Stavrianopoulos et al., 1971.
Linfocitos humanos	DNA polimerasa III	Reverso transcriptasa	Mn++	Lewis et al., 1974.
B. subtilis	DNA polimerasa III	RNA polimerasa	Mn++	Low et al., 1976.
HIV-1	Reverso transcriptasa	RNA replicasa	Mg++ por Mn++	Valverde et al., 1989; Lazcano et al., 1991a.
Virus de la mieloblastosis de ave (AMV)	Reverso transcriptasa	RNA replicasa	Mg++ por Mn++	Valverde et al., 1990.
Macrófagos de humano	?*	RNA replicasa	Mn++	Neuhoff et al., 1970.
Halobacterium cutirubrum	?*	RNA replicasa	Mn++, Mg++, Mn++ y Mg++	Louis y Fitt, 1971.
Reticulocitos de conejo	?*	RNA replicasa	Mn++	Downey et al., 1973.
G. aurantica	?*	RNA replicasa	Mn++	Rivera-Bustamante y Semancik, 1989.
G. aurantica	?*	RNA replicasa	Mg++	Rivera-Bustamante y Semancik, 1989.

* Dado que se sabe que no existen RNA replicasas celulares, la replicación de RNAs con extractos celulares reportados en estos

trabajos indica que alguna polimerasa celular, en las condiciones de ensayo usadas en cada caso, está cambiando de especificidad in vitro.

TABLA 3. Polimerasas que forman cadenas híbridas de ribo y desoxiribonucleótidos en la misma hebra.

ENZIMA	MOLDE	CONDICIONES	REFERENCIA
RNA polimerasa de <i>Azotobacter vinelandii</i>	DNA	in vitro	Krakow y Ochoa, 1963.
RNA polimerasa de <i>M. lisodeikticus</i>	DNA	in vitro	Cheng y Ts'oo, 1965.
Primasa de <i>E. coli</i>	DNA	in vitro*	Rowen & Kornberg 1978; McMacken y Kornberg, 1978.
Reverso transcriptasa del HIV-1	RNA	in vitro*	Valverde, 1989; Lazcano et al., 1992c.
DNA polimerasa de <i>E. coli</i>	DNA	in vitro	Berg et al, 1963.
DNA polimerasa de T4	DNA	in vivo	Buckley et al., 1972.
DNA polimerasa III de <i>E. coli</i>	DNA	in vivo	Speyer, 1972; Buckley et al., 1972. Rosenkrans, 1973.
DNA polimerasa A de bovino	DNA	in vivo	Babiuk y Rouse, 1976.
Reverso transcriptasa del SNV (virus de la necrosis del bazo).	RNA	in vivo	Chen y Temin, 1980.
Fragmento Klenow	DNA	in vitro	Este trabajo

*Usando condiciones naturales de ensayo

TABLA 4. Evidencias de síntesis "anómalas" in vivo por alguna polimerasa.

GENOMA	HEBRAS "ANOMALAS"	AISLADAS EN	REFERENCIA
Virus del sarcoma de ave	RNA (-)	Fibroblastos de embrión de pato	Stavnezer et al., 1976.
Virus del tumor de mama de ratón	RNA (-)	Mama de ratón	Stavnezer et al., 1976.

Por otra parte, Rackwitz et al. (1981) llevaron a cabo experimentos en los que observaron que la RNA polimerasa II del tomate (*Lycopersicon peruvianum*) y la RNA polimerasa II del germen de trigo copian *in vitro* a varios viroides, así como a otras clases de RNAs naturales y sintéticos usando mezclas de cofactor Mn^{++} y Mg^{++} como cofactor.

Aparte de estos estudios, Goodman et al. (1984) midieron la constante de asociación (K_a) de la RNA polimerasa II del germen de trigo en las condiciones naturales de ensayo (con 5mM de Mg^{++} como cofactor), a los RNAs del PSTV (viroide del eje de la papa) ($K_a=19 \times 10^{-6} \cdot M^{-1}$), y ssCARNAS5 (RNA uncatenario asociado al virus del mosaico del pepino) ($K_a=7.6 \times 10^{-6} \cdot M^{-1}$), y concluyen que la RNA polimerasa II se une a estos genomas de RNA con mucho más fuerza que el valor encontrado en una interacción proteína-ácido nucleico no específica ($K_a=0.3 \times 10^{-6} \cdot M^{-1}$). Además, en las condiciones naturales de ensayo, esta enzima replica *in vitro* estos mismos viroides, funcionando así como una RNA replicasa (Goodman et al., 1984).

Estos experimentos demuestran claramente que los viroides analizados en estos estudios al infectar las células son replicados por la RNA polimerasa II DNA-dependiente celular que *in vivo* está funcionando como una RNA replicasa.

Sin embargo, Symons (1989) ha sugerido que la responsable de la replicación de estos viroides es una RNA replicasa aún desconocida. Él sugirió la misma explicación tanto para los virusoides (que constan de una sola hebra de RNA) como para los RNAs lineales satélites y encapsidados, ya que no se ha demostrado que la RNA polimerasa II sea la responsable de la replicación *in vivo* de estos tres últimos tipos de RNAs. Como veremos más adelante, existen argumentos que sugieren que la replicación la debe llevar a cabo una polimerasa celular conocida que, dada su flexibilidad enzimática, está cambiando *in vivo* de sustrato.

Por otra parte, se sabe que durante la replicación del RNA satélite del STobRV (virus de la mancha anillada del tabaco), la forma dimerica se rompe autocatalíticamente (sin la participación de enzimas) generando dos RNAs monoméricos y dos fragmentos terminales (uno 5'-hidroxilo, y uno fosfodiéster 2':3' cíclico). Después, estos RNAs se ligan espontáneamente formando monómeros lineales y circulares (Buzayan et al., 1986). El mismo fenómeno de reacción autocatalítica de hidrólisis y ligamiento se presenta durante la replicación del ASBV (viroide de la mancha de sol del aguacate) (Hutcins et al., 1986), el VLTSV (viroide de la raya transitoria de la lucerna) (Foster y Symons, 1987), y un RNA satélite de tritón (Epstein y Gall, 1987). Prody et al. (1986) observaron que esta reacción de autoescisión produce formas monoméricas lineales de estos RNAs, a partir de un polímero que se genera durante la replicación del genoma por círculo rodante. Lo mismo sucede con el RNA uncatenario genómico del HDV (virus delta de la hepatitis) (Wu, 1990).

Al respecto, Hutchins et al. (1985) ha notado el surgimiento de formas electroforéticas lentas del CCCV (viroide del cadang-cadang del coco), que involucran una duplicación del extremo derecho del RNA genómico sólo durante la infección. Este mismo grupo reportó también la presencia de las bandas X asociadas con las formas (+) de los viroides del ASEV, RNA 2 del SNMV (virus de la veta de *Solanum nodiflorum*), y RNA 2 del VTMoV (virus del terciopolo moteado del tabaco). Tales rearreglos intramoleculares genómicos, cuyos mecanismos son aún desconocidos, llevaron a Hutchins et al. (1985) a la conclusión de que además de los mecanismos de replicación en círculo rodante que se conocen para muchos viroides, virusoides y RNAs satélites pequeños, otros procesos tales como estos rearreglos del genoma mismo pueden estar también involucrados en su replicación.

Tanto los procesos de replicación por círculo rodante, como los rearreglos intracatenarios genómicos producidos por las reacciones autocatalíticas de hidrólisis y ligamiento mencionados arriba, deben estar interaccionando y coordinados, de alguna manera, con el proceso de polimerización, mismo que lleva a cabo la polimerasa encargada de replicar a estos RNAs en la célula. Es decir, dado que no hay RNA replicasas celulares, la polimerasa del hospedero que replica estos replicones estaría, entonces, cambiando de especificidad, in vivo, al interaccionar con los mecanismos metabólicos de estas entidades.

El problema ha sido analizado por Keese and Symons (1985), quienes propusieron un modelo de dominios a partir del análisis de las secuencias y estructuras de los viroides. Según este modelo, en dichos viroides la función está relacionada con cinco regiones estructuralmente distinguibles; una de ellas en particular, la hélice que forma un tallo y asa (que se encuentra altamente conservada) en el llamado dominio C, se parece a varios sitios de unión de otros RNAs a proteínas, y en particular al sitio de unión del rRNA a la proteína ribosomal L18, que en estos viroides puede estar señalando la unión y/o iniciación de la RNA polimerasa celular encargada de la síntesis de la cadena (-).

Por otra parte, la unión específica in vitro a los dominios T1 y T2 (en este modelo) por la RNA polimerasa II DNA-dependiente celular (Goodman et al., 1984) sugiere fuertemente que estos dominios tienen una función en la replicación de estos RNAs.

De lo anterior se puede concluir que no es necesario proponer la existencia de una polimerasa específica celular para replicar estos genomas, como ha sugerido Symons (1989).

En este trabajo se discute la posibilidad de que la replicación de estos RNAs la puede estar realizando alguna polimerasa celular que estaría cambiando de especificidad, dado que estas enzimas son intrínsecamente flexibles, tanto por su molde como por el sustrato y cofactor que aceptan para realizar su actividad catalítica. Asimismo, en este trabajo se propone que, por lo tanto, el cambio en la

utilización de un molde de DNA a uno de RNA, para la replicación de tales entidades foráneas de RNA por una polimerasa DNA-dependiente más bien yace, no en la polimerasa misma, que es intrínsecamente poco específica, sino en mecanismos reguladores globales que actúan en conjunto. Estos incluyen: a) las secuencias de unión a proteínas en estos RNAs, b) los rearrreglos intragenómicos que se dan durante la replicación de algunos de estos RNAs, y c) la regulación de las concentraciones locales de los nucleótidos por otras enzimas alostéricas responsables de ello, tales como la ribonucleótido reductasa y los diferentes sistemas de reducción acoplados a ésta como la tiorredoxina y la tiorredoxina reductasa, o la glutatión reductasa y la glutarredoxina. Los estudios de Thelander y Reichard (1979), Kornberg (1980), y Holmgren (1981, 1989), indican que ambos complejos se encuentran tanto en eucariontes como en eubacterias.

La hipótesis que se discutirá en este trabajo es la de que estos complejos enzimáticos estarían regulando y compartamentalizando en el lugar preciso de la síntesis de DNA las concentraciones de ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos en todas las fases del ciclo celular (Lazcano et al., 1992b). Las evidencias de que esto sí sucede se darán más adelante.

Los resultados de las Tablas 1-4 se interpretan en esta tesis como evidencia directa de que las polimerasas son enzimas que pueden aceptar una amplia gama de moldes, sustratos y cofactores, para realizar una clase o familia de reacciones, más que un tipo de reacción en particular. Como se mencionó antes, esta falta de especificidad que muestran las diferentes polimerasas actuales puede ser un vestigio evolutivo del tipo de metabolismo que poseían las células primigenias y dan un apoyo a las ideas de Waley (1969), Blake (1974), Yças (1974) y Jensen (1976); esto es, su flexibilidad y traslapamiento de capacidades enzimáticas serían un vestigio del estado metabólico en el que surgieron.

III. MATERIAL Y METODOS

Reactivos. El Etilendiaminotetraacetato de sodio (Na -EDTA), Trizma base (tris [hidroximetil] aminometano), tritón X-100, bactotripton, extracto de levadura y lisozima, fueron obtenidos de Sigma Chemical Company; el hidróxido de sodio, cloruro de potasio, fosfato de potasio, cloruro de magnesio, cloruro de manganeso, sulfato de amonio, ácido sulfúrico, etanol, tolueno, glicerol, fosfato disódico básico, tris [hidroximetil] amino metano-ácido clorhídrico (tris-HCl) fueron obtenidos de Merck; el ditiotreitól (DTT), CTP, UTP, ATP, GTP, dCTP, dTTP, dATP y dGTP no marcados, DNA total de timo de ternera, provinieron de Calbiochem Co.; el cloruro de sodio, ácido clorhídrico y el alcohol isoamílico, fueron de J. T. Baker S. A.; el 32PÁ-CTP (activ. esp.= 3000 Ci/mmol), 3H[1',2',5]-dCTP (activ. esp.=52 Ci/mmol), 32PÁ-dATP (activ. esp. = 6000 Ci/mmol) y cebador al azar, fueron de Amersham International plc.; el fragmento Klenow, Bgl I y Eco RI, fueron obtenidos de New England Biolabs. El papel DE-81 fue Wathman; el Crystal Fluor fue de ICN Nuclear England. Se usó agua bidestilada y desionizada estéril en todos los experimentos.

El plásmido p18/42, que contiene la región no codificadora del papilomavirus humano tipo 18 unido al gen de la cloranfenicol acetil transferasa (Thierry, et al., 1987), se cortó con Eco RI o con Bgl I para linealizarlo y usarlo como molde; para este DNA se utilizó el cebador 30Y1. El plásmido pLCR, que contiene la región control larga del papiloma virus tipo 18 se cortó con Eco RI para linealizarlo, y usarlo como molde; se usó el cebador 18Y2 para que la polimerasa sintética un fragmento de 300 pb complementario a este DNA.

Ensayos enzimáticos del fragmento Klenow. Las condiciones de reacción fueron realizadas con tris-HCl pH 8.0 50 mM, NaCl 50 mM y 1 unidad de enzima. Las concentraciones del cofactor (MgCl o MnCl), del molde, cebador y nucleótidos se indican en cada experimento.

Justo antes de cada ensayo se hacían las mezclas de los NTPs, la desnaturalización del DNA (5 minutos en ebullición e inmediatamente se ponía en hielo) y se diluía la enzima 10 veces en buffer de disolución (KPO 0.1 M pH 6.5, DTT 1 mM y glicerol 50%). Todas las reacciones se realizaron en un volumen total de 50 µl a 37° C durante 30 minutos, y se paraban con EDTA 250 mM. El producto de la reacción se colocaba en papeles Whattman DE-81, se dejaban secar y se les hacían 5 lavados de 5 minutos cada uno en Na HPO 0.5 M, dos en agua bidestilada y dos en etanol industrial. Se secaban y se contaba su reactividad en viales con 5 ml de líquido de centelleo (0.6 g de Cristal Fluor/1 ml de tolueno) en un contador de centelleo Packard mod. 1500 TRI-CARB.

La incorporación de nucleótidos radioactivos se midió según los siguientes valores (Horrock, 1974):

1 μ Ci = 2.22×10^6 cuentas por minuto (c.p.m.), y:

1 μ Ci = 0.166 picomoles de 32 PÁ-dATP (Act. esp. = 6000 Ci/mmol).

1 μ Ci = 0.333 picomoles de 32 PÁ-rCTP (Act. esp. = 3000 Ci/mmol).

1 μ Ci = 192.3 picomoles de 3 H[1',2',5]-dCTP (Act. esp. = 52 Ci/mmol).

IV. RESULTADOS

Se hicieron ensayos enzimáticos con el objeto de evaluar el efecto de la presencia de ribonucleótidos durante la síntesis de DNA por el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli*, que utiliza como sustrato natural desoxirribonucleótidos (Figura 1). Esta es una enzima dependiente de Mg^{++} , y se sabe que este metal confiere alta especificidad en la elección del sustrato (Loeb, et al., 1979). Por ello, se realizó primero un experimento en condiciones naturales de este metal, a fin de ver cuál es la capacidad de esta enzima de discriminar los rNTPs como sustratos erróneos.

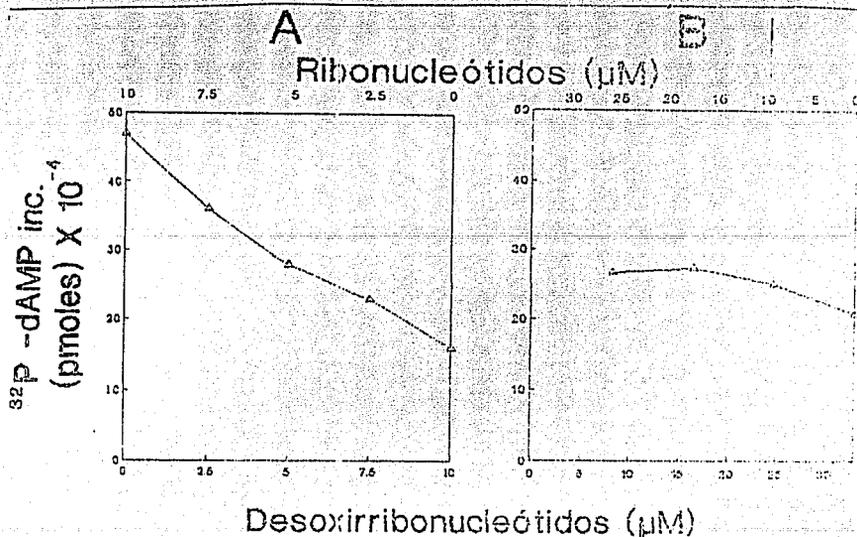


Figura 1. Síntesis de DNA por el fragmento Klenow en presencia de rNTPs y dNTPs a la vez. A medida que aumenta la concentración de

dNTPs, proporcionalmente disminuye la concentración de rNTPs. El experimento se realizó dos veces: en A), la suma de los cuatro rNTPs más los cuatro dNTPs es igual a $10 \mu\text{M}$ en cada punto; en B), la suma de rNTPs más los dNTPs es igual a $33 \mu\text{M}$ en cada punto. Se usó 1 u de enzima, 10 mM de Mg^{++} , $10 \mu\text{g}$ de DNA total de timo de ternera como molde, 10 picomoles de cebadores al azar y 0.332 picomoles de $32\text{P}\alpha\text{-dATP}$ (Act. esp. = 6000 Ci/mmol). Las condiciones de ensayo se describen en Material y Métodos.

En este experimento (Fig. 1), a medida que la concentración de dNTPs aumenta, la concentración de rNTPs disminuye proporcionalmente y las cadenas sintetizadas contienen cada vez menos dATP marcado. Esto podría significar que sí hay cierta "elección" por parte de la polimerasa en cuanto a la aceptación de los dNTPs sobre los rNTPs.

Esto significa que se está incorporando casi solamente dATP, y muy poco o nada de rNTPs, quienes entonces no están compitiendo con el dATP. A medida que aumentan los dNTPs no marcados presentes en la reacción, entonces estos sí compiten con el dATP marcado, ya que son sustratos que la polimerasa distingue como "correctos".

Debido a los resultados anteriores, se hicieron experimentos con el fin de cuantificar el efecto de los rNTPs como sustrato durante la síntesis de DNA (incorporación de dATP marcado), con Mg^{++} como cofactor, y compararlo con el efecto de una síntesis de DNA normal, es decir en presencia de dNTPs como sustrato y sin que haya mezcla de ambos durante la síntesis de las nuevas cadenas (Figura 2). Se usaron también las condiciones de ensayo óptimas para esta enzima (ver pie de la Figura 1).

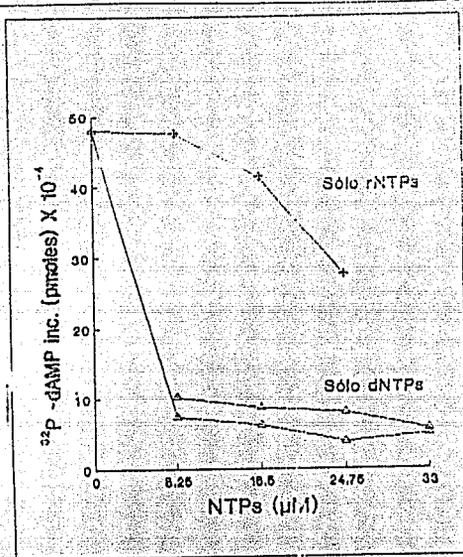


Figura 2. Síntesis de DNA por el f. Klenow en presencia de concentraciones crecientes de rNTPs, o dNTPs no marcados. Se usaron 0.332 picomoles de $^{32}\text{P}\alpha\text{-dATP}$ (act. esp. = 6000 Ci/mmol). Las condiciones de ensayo fueron como en la Figura 1.

En el experimento con dNTPs solos, se observó que en el punto donde únicamente hay dATP marcado, es decir, ausencia de dNTPs no radioactivos, existió la más alta incorporación de dATP marcado, esto es, todas las cadenas sintetizadas de novo están compuestas exclusivamente de dATP marcado. Pero en el momento en que empieza a haber dNTPs no marcados presentes, éstos compiten con el dATP marcado y también son incorporados en las nuevas cadenas.

Comparando este experimento con los ensayos que tienen rNTPs como sustrato competidor (Fig. 2), vemos que con $8.25 \mu\text{M}$ de rNTP presentes existió la misma incorporación de dATP marcado que en el punto en el que sólo hay dATP marcado, lo que nos está indicando claramente que al menos hasta esta concentración de rNTPs, éstos no están siendo incorporados por esta enzima en las nuevas cadenas de DNA, es decir, que estas nuevas cadenas están formadas exclusivamente de dATP marcado.

Sin embargo, a medida que aumenta la concentración de rNTPs presentes, disminuye la incorporación de dATP radioactivo, aunque no tan bruscamente como con las mismas concentraciones de dNTPs.

Los experimentos con rCTP marcado y diferentes concentraciones de los otros tres rNTPs no marcados, en presencia de manganeso (Figura 3), mostraron que la enzima sí incorpora rNTPs.

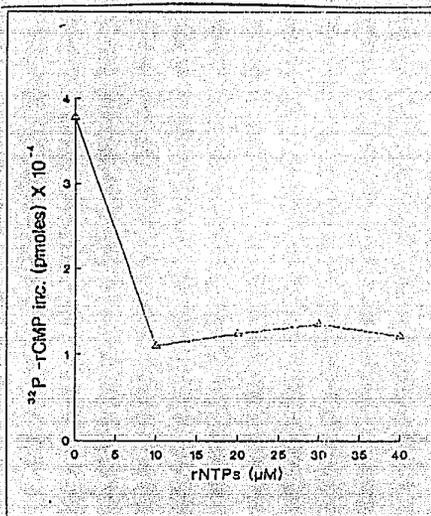


Figura 3. Incorporación de rCTP en presencia de 1mM de Mn^{++} y concentraciones crecientes de rNTPs. Se utilizaron 1.665 picomoles de ^{32}P -rCTP (Act. esp. $0 = 3000 \text{ Ci/mmol}$). Las condiciones enzimáticas fueron como en la Fig. 2.

La síntesis de cadenas de RNA en presencia de diferentes concentraciones de manganeso se comparó con aquella obtenida con diferentes concentraciones de magnesio (Figura 4). En estos experimentos vemos que en presencia del cofactor natural (10 mM de Mg^{++}), esta enzima funciona como RNA polimerasa. Sin embargo, cuando trabaja en presencia de manganeso dicha actividad alterna es mayor, con un óptimo a 1.5 mM de manganeso. En esta concentración de Mn^{++} , esta enzima incorporó alrededor de 5 veces más rNTPs con Mn^{++} que con Mg^{++} .

En presencia de una concentración óptima de Mn^{++} (1.5 mM) y diferentes concentraciones de Mg^{++} , se observó (Figura 5) que la incorporación (4 veces más que con 1.5 mM de Mn^{++} y 8 veces más que

con 10 mM de Mg^{++}) cuando en el medio estaban presentes ambos iones, siendo el pico de actividad a 1.5 mM de Mn^{++} y 0.1 mM de Mg^{++} .

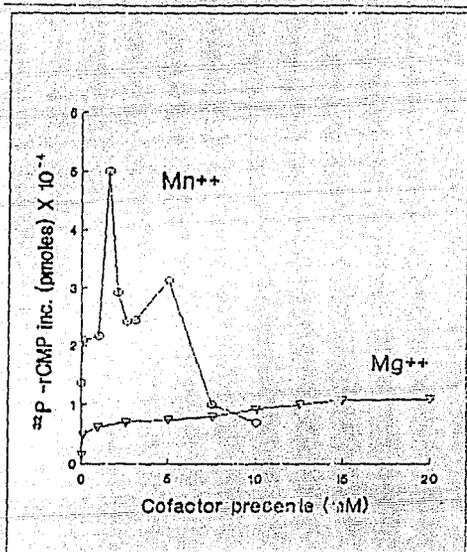


Figura 4. Incorporación de rCTP en presencia de diferentes concentraciones de Mn^{++} o Mg^{++} . Se usó 1 u de enzima, 5 μg de DNA del plásmido p18/42 linearizado como molde, 10 pmoles de cebador 30Y1, 10 μM de rGTP, rATP y rUTP, y 0.666 pmoles de ^{32}P -rCTP.

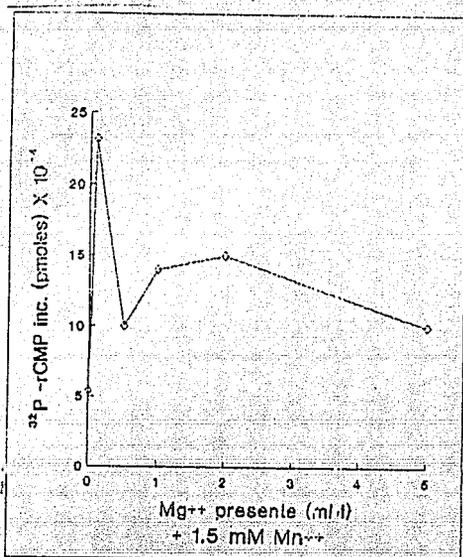


Figura 5. Incorporación de ^{32}P -rCTP en presencia de 1.5 mM de Mn^{++} y diferentes concentraciones de Mg^{++} . Las condiciones de ensayo fueron como en la Fig. 6.

Finalmente, utilizando las concentraciones óptimas de cofactor para la incorporación de rNTPs encontradas en esta tesis (1.5 mM de Mn^{++} y 0.1 mM de Mg^{++}), se hicieron experimentos en presencia de rNTPs y dNTPs en el mismo ensayo (Figura 6), de modo que a medida que la concentración de dNTPs disminuye, la concentración de rNTPs aumenta y la suma de ambos es siempre la misma en cada punto. En estos experimentos vemos que existe incorporación de ambos tipos de nucleótidos, y la incorporación máxima de rNTPs ocurrió cuando la proporción es 4 rNTPs/1 dNTPs. A esta concentración la tasa de error fue de 1/170. Cuando los rNTPs y dNTPs se encontraron en proporciones equimolares, la tasa de error fue de 1/1000 cuando la

concentración total era de $0.5 \mu\text{M}$, y de $1/400$ cuando la concentración total era de $0.05 \mu\text{M}$ de nucleótidos.

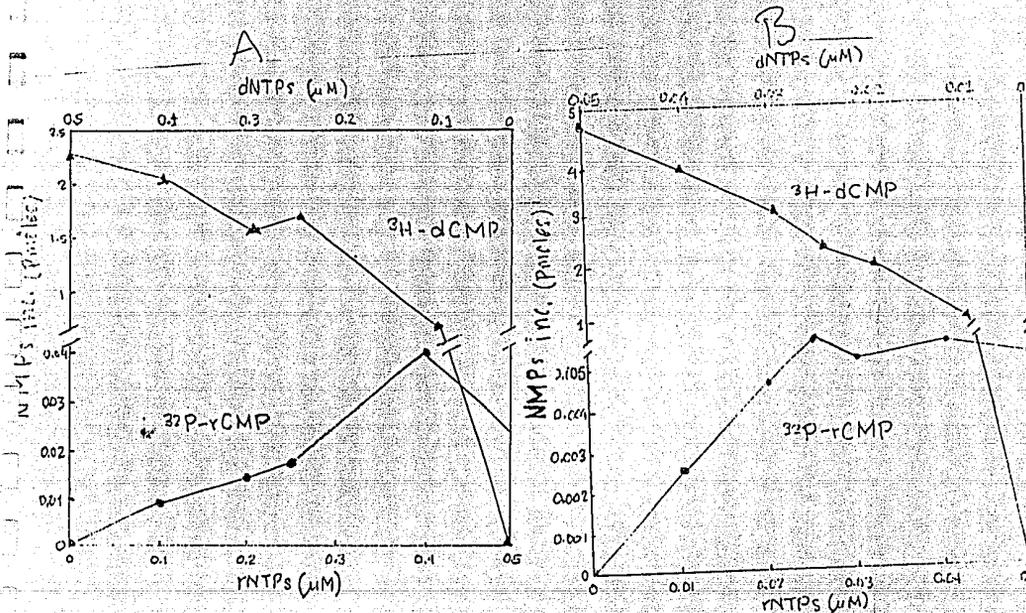


Figura 6. Incorporación de rNTPs y dNTPs. Se usó $^{32}\text{P}\alpha\text{-rCTP}$ (Act. esp. = $3000\text{Ci}/\text{mmol}$), $^3\text{H}[1',2',5']\text{-dCTP}$ (Act. esp. = $52\text{Ci}/\text{mmol}$), 1u de enzima, 1.5mM de Mn^{++} , 0.1mM de Mg^{++} , $5\mu\text{g}$ de DNA linealizado del plásmido pLCR como molde, 10pmoles de cebador 30Y1, y diferentes concentraciones de dNTPs y rNTPs, de modo que en A) en cada punto la suma de ambos es igual a $0.5\mu\text{M}$, y en B) la suma es igual a $0.05\mu\text{M}$. Las concentraciones de los nucleótidos radioactivos son iguales, en cada caso, que la de los no marcados.

v. La evolución del replisoma

Entre los componentes moleculares que participan en la replicación del DNA se encuentran las DNA helicasas, las topoisomerasas, las proteínas desestabilizadoras de la doble hélice, la DNA polimerasa y el primosoma, que en procariontes está formado por la primasa, la proteína *i*, el producto del gen *dnaB*, y otros 18 péptidos adicionales de menor peso molecular (Kornberg, 1988; McMacken et al., 1987; Watson et al., 1987; Alberts, 1990). Debido a que no requieren al menos del primosoma, esta estructura es más simple en el caso de la síntesis en el citoplasma del DNA de los retrovirus, es decir, de entidades genéticas que codifican para una reverso transcriptasa, como los retrovirus, o los elementos copia de *Drosophila* (Fuetterer y Hohn, 1987).

Este complejo de proteínas operan muy cerca de la horquilla de replicación, pues en el lugar preciso donde se está llevando a cabo la síntesis de una nueva cadena de DNA, es decir, el replisoma, se enumeran como sus componentes sólo a la DNA polimerasa (o una reverso transcriptasa en el caso de la replicación en el citoplasma de los retrovirus) y a las proteínas desestabilizadoras del DNA (Kornberg, 1988; McMacken et al., 1987; Watson et al., 1987; Alberts, 1990).

Puesto que existen muchas evidencias que sugieren que el RNA antecedió al DNA como portador de la información genética (Alberts, 1986; Lazcano, 1992; Lazcano et al., 1988a, 1992b, 1992c), la transición evolutiva de los genomas de RNA primitivos a los genomas de DNA que actualmente poseen todas las células, debe ser entendida también en términos de la evolución de la maquinaria catalítica que los sintetiza, cuyos componentes básicos formaban parte del complejo enzimático que originalmente replicaba los genomas de RNA. Estos componentes son principalmente las polimerasas y las enzimas involucradas en el metabolismo de sus sustratos (los nucleótido trifosfatos). Es decir, la evolución del replisoma puede ser vista como un proceso que se dio paralelamente a la evolución del material genético. A su vez, los mecanismos metabólicos y la estructura secundaria [arreglada en dominios, como los definen Keese y Symons (1989)], discutidos arriba, que poseen las entidades genéticas foráneas como los viroides, virusoides y RNAs satélites, serían vistas como estrategias de replicación que aprovechan la poca especificidad enzimática de las polimerasas y de la estructura y funcionalidad del replisoma, que a su vez es producto de dicha flexibilidad enzimática. Las estrategias metabólicas (rearreglos intracatenarios) y de replicación que han seguido dichas entidades genéticas han por lo tanto evolucionado en paralelo con el replisoma.

La idea del origen de las rutas metabólicas por "parches" implica que las enzimas que catalizan reacciones

similares en diferentes rutas deben de ser homólogas (Lazcano et al., 1992b). Esto efectivamente vemos que sucede con las polimerasas actuales.

Como han argumentado Clayton et al. (1979) y Kunz (1982) al discutir la incorporación errónea de análogos de ribo y desoxirribonucleótidos (como bromouracilo, 2-aminopurinas, pseudouridina, inosina, 7-metil guanosina, dihidrouracilo, etc.) como sustratos durante la replicación de los ácidos nucleicos por parte de las polimerasas, y Batula y Loeb (1974) y Agarwal et al. (1979), para explicar la tasa de incorporación de los nucleótidos no complementarios (como el caso de las parejas G-A, C-T, por ejemplo) por las distintas polimerasas durante la replicación del DNA, una de las causas más importantes que provocan estos errores es la existencia de una concentración elevada de estas moléculas análogas en la poza de los nucleótidos que serán usados como sustratos por la polimerasa en la síntesis de una cadena nueva de ácido nucleico.

Otro de los factores clave para determinar la fidelidad de las polimerasas durante la síntesis de los distintos tipos de ácidos nucleicos es el metal que se usa como cofactor.

Las polimerasas son enzimas que requieren la participación de un ion metálico divalente presente en el medio como activador de la enzima, para que ésta pueda llevar a cabo la síntesis de un ácido nucleico (Loeb y Mildvan, 1981; Mildvan y Loeb, 1981). Se ha demostrado que su función es coordinar la enzima con el sustrato en la forma de un complejo enzima-metal-sustrato (Solan et al., 1975).

El cofactor generalmente utilizado por las DNA y RNA polimerasas celulares y virales es el Mg^{++} , y es el que confiere la mayor fidelidad de copiado (Kornberg, 1980; Loeb y Zakour, 1980; Lewin, 1990). Sin embargo, el funcionamiento óptimo de las diferentes reverse transcriptasas puede requerir Mn^{++} o Mg^{++} (Scolnick et al., 1970), en concentraciones diferentes a las que usan las DNA polimerasas. De hecho, el solo cambio en las concentraciones del mismo cofactor que naturalmente usa una enzima provoca que ésta pierda especificidad. Tal es el caso de una DNA polimerasa de reticulocitos de conejo (Downwy et al., 1973), y de una posible DNA polimerasa aislada de hojas de G. aurantica (Rivera-Bustamante y Samencick, 1989), que presentan actividad de RNA replicasa, in vitro, simplemente al aumentarle de 8 a 10 veces la concentración de Mg^{++} durante el ensayo enzimático.

Asimismo, la RNA polimerasa II humana (Sugden y Keller, 1973), la RNA polimerasa de rata y la RNA polimerasa de erizo de mar (Roeder y Rutter, 1969) requieren manganeso para su actividad óptima.

Aunque se ha argumentado que las reverse transcriptasas (RTs) son dependientes de Mn^{++} o de Mg^{++} según la línea filogenética a la que pertenecen, es decir, las que usan

Mn⁺⁺ como cofactor están separadas evolutivamente de las que usan Mg⁺⁺ (Sonigo et al., 1985; Garvey et al., 1990), un análisis detallado directo de las caracterizaciones bioquímicas de tales enzimas revela que esto no necesariamente es así (Tabla 5), y que la actividad óptima reportada con cada uno de estos metales dependen del tipo de experimento realizado en cada laboratorio.

Basta ver los reportes bioquímicos originales que se tienen sobre una misma enzima para percatarse de los problemas que hay para concluir cuál es el cofactor con el que dicha enzima funciona óptimamente. Por ejemplo, en la Tabla 6 se enlistan las condiciones usadas por diferentes laboratorios para medir la actividad enzimática de la reverso transcriptasa del AMV. Allí vemos que muchos de los estudios no buscan específicamente con qué metal funciona mejor la enzima y cuál es su concentración óptima, a diferentes pHs, a diferentes concentraciones de cationes monovalentes, etc.

A diferencia del Mg⁺⁺, el Mn⁺⁺ provoca pérdida de especificidad por el sustrato en todas las DNA polimerasas celulares y virales, provocando una alta tasa de mutación al incorporar nucleótidos no complementarios, o bien induciendo la incorporación de análogos de nucleótidos. Lo mismo ocurre con el Co⁺⁺, Zn⁺⁺, Fe⁺⁺, Cr⁺⁺, Cu⁺⁺, Ni⁺⁺, Ag⁺⁺, Be⁺⁺, Cd⁺⁺ y Pb⁺⁺, aunque la actividad enzimática con estos iones siempre es mucho menor (Battula y Loeb, 1974; Agarwal et al., 1979; Sirover et al., 1979; Loeb y Zakour, 1980; Mildvan y Loeb, 1981; Loeb y Mildvan, 1981).

Debido a estos dos factores, es decir, tanto a la alta concentración del sustrato correcto que deben tener las pozas locales (justo en el replisoma) de nucleótidos, así como a la presencia y concentración indispensable del cofactor metálico adecuado (Mg⁺⁺ o Mn⁺⁺) en el mismo sitio, durante la evolución de las polimerasas, el tipo de reacción particular en la que se fue especializando cada polimerasa (replicación de DNA, de RNA, transcripción o reverso transcripción) se debió sobre todo a que se les fueron agregando subunidades reguladoras y/o se fueron formando complejos multienzimáticos que, en conjunto, fueron controlando estos dos factores (concentración y tipo de sustrato y cofactor) y, que también en conjunto, fueron sesgando la catálisis hacia la reacción deseada.

Esto significa que los componentes que se fueron agregando para cada tipo de polimerasa (DNA polimerasa, RNA polimerasa, RNA replicasa o RT) fue distinto, según la función particular que realiza. Por ejemplo, sabemos que las diferentes RNA polimerasas poseen distintos factores de transcripción y diferentes subunidades que forman distintos agregados multienzimáticos alrededor de los péptidos catalíticos (Losick y Chamberlin, 1976; Zillig et al., 1985), tanto en procariontes como en eucariontes, lo que da su diferenciación funcional. Lo mismo sucede con las DNA polimerasas procariontes (Kornberg et al., 1980) y eucariontes (Weissbach, 1977; Hübscher, 1984).

Tabla 5. Metal divalente usado como cofactor por distintas reverse transcriptasas.

RT DE ¥	ION QUE USA	OBSERVACIONES	REFERENCIA
Virus del sinsicio de primate	Mn++		Scolnick et al., 1970.
SSV	Mn++ *	El Mg++ inhibe	Abrell, 1973.
SiSV	Mn++ *		Sangadharan, 1976.
SSV (SSAV)	Mn++ *		Poiez et al., 1980.
M-PMV	Mg++	El Mn++ inhibe.	Abrell, 1973.
MP-MV	Mg++ Mn++ *	Con Mn++, muy poco	Howk et al., 1973.
M-PMV	Mg++ Mn++ *		Gilden et al., 1975.
M-PMV	Mg++		Sangadharan, 1976.
Virus tipo C de gibón	Mn++ *		Howk et al., 1973.
GAL endógeno	Mn++		Mondall et al., 1975.
GaLa extracelular virus (extracelular)	Mn++ *		Mondall et al., 1975.
RSV	Mn++ *	Mg++ Trabaja bien con cualquiera	Scolnick et al., 1970.
RSV	Mg++ Mn++ *		Faras et al., 1972.
RSV	Mn++	Mg++ Cuando es DNA pol. DNA-dependiente, el Mg++ es el ion óptimo.	Faras et al., 1972.
Partículas MOPC-104E tipo A del ratón BALB/c	Mg++ *	Mn++	Wilson, 1972.
Partículas intracister- nales A de las MOPC 104E	Mn++ *	Mg++	Weiman, 1978.
MOPC-315 del mieloma de	Mn++	El Mg++ inhibe	Hizi et al.,

murino				1980.
RLV	Mn++ *	Mg++	Con Mg++ sólo con el RNA endógeno	Scolnick et al., 1970.
MuLV	Mn++ *	Mg++	Pero la actividad DNA-dependiente es más eficiente con Mg++	Wilson, 1972.
RLV	Mn++			Abrell, 1973.
MMTV	Mn++ *			Scolnick et al., 1970.
MMTV	Mg++ *	Mn++		Howk et al., 1973.
MMTV	Mg++ *			Sangadharan, 1976.
SFFV-LLV	Mn++ *	Mg++		Weimann et al., 1975.
Partículas tipo A citoplásmicas de MMTV ENZIMA 1	Mg++ *	Mn++	Con Poli(A)-oligo dT sólo trabaja con Mn++	Kohono et al., 1979.
Partículas tipo A citoplásmicas de MMTV ENZIMA 2	Mg++ *	Mn++	Con Poli(A)-oligo dT sólo trabaja con Mn++	Kohono et al., 1979.
Virus tipo C de la leche del ratón BALB/c	Mn++ *			Howk et al., 1973.
MTV de la leche del ratón suizo NIH	Mn++ *			Howk et al., 1973.
MTV tipo B de la leche del ratón RIII	Mg++ *	Mn++		Howk et al., 1973.
PLPC	Mg++			Moening et al., 1974.
Virus del fibroblasto del riñón de felino	Mn++			Livingston et al., 1973.
Virus RD-114 endógeno de felino	Mn++ *	Mg++		Gilden et al., 1975.
Viriones HEL-12 de fibroblasto del pulmón humano	Mn++			Panem et al., 1975.
HTLV	Mg++	Mn++	Pero es óptimo	Poiez et al.,

	*	con ambos	1980.
Partículas retrovirales tipo A de <i>D. melanogaster</i>	Mn++ *	No ensayan diferentes conc. de Mg++ y Mn++	Heine et al., 1980.
<i>Paramecium tetraurelia</i>	Mn++ Mg++ *		Katinka, 1987.
Genoma de mitocondria de <i>Podospora anserina</i>	Mn++	No ensayan con Mg++	Steinhilber, 1986.
Plásmido mitocondrial de <i>Neurospora</i> sp.	Mg++	No ensayan con Mn++.	Kuiper et al., 1990.
HFV	Mn++ *		Hruska et al., 1975.
HaRV	Mn++		Grgerson et al., 1979.
AMV	Mn++ *		Scolnick et al., 1970.
AMV	Mg++ *	Pero es óptimo con ambos	Leis y Hurwitz, 1972; Hurwitz y Leis, 1972.
AMV	Mg++ *	Un poco menos con Mn++	Gregerson et al., 1979.
REV	Mg++ *	Un poco menos con Mn++	Bauer y Hofschneider, 1976.
ASV B77	Mn++ *	Mg++ *	La preferencia por el ion depende del molde usado Hizi et al., 1980.
Virus del Visna	Mg++ *		Scolnick, et al., 1970.
BLV	Mg++ *		Gilden et al., 1975.
HIV-1	Mg++ *		Ratner et al., 1985.

* Ion con el que la enzima funciona mejor sólo a la concentración que usó cada autor.

‡ Abreviaciones: SSV, virus del mono lanudo (virus del sarcoma de simio);

SiSV, virus del sarcoma de simio; SSV (SSAV), virus de simio asociado al virus del sarcoma de simio; M-PMV, MP-MV, virus del mono masón Pfizer; GAL, GaLa, virus de la leucemia de gibón; RSV, virus del sarcoma de Rous; MOPC-104E, tumor de las células 104E plasmáticas de ratón; RLV, virus de la leucemia de murino de Rauscher; MuLV, virus de la leucemia de murino; MTV, MMTV, virus del tumor mamario de murino; SFFV-LLV, complejo del virus amigo de murino (virus de la leucemia linfótica-virus del foco del bazo); PLPC, partícula tipo C de la leucemia de cerdo; HFV, virus espumoso que forma sinsicios de hamster; HaRV, retrovirus de hamster; AMV, virus de la mieloblastosis de ave; REV, virus de la reticuloendoteliosis de ave; ASV, virus del sarcoma de ave; BLV, virus de la leucemia de bovino; HIV, virus de la inmunodeficiencia humana; HTLV, virus de la leucemia de las células T de humano.

NOTA: se usaron las abreviaciones y nombres que cada autor usa en su trabajo.

Si las polimerasas actuales son menos específicas de lo que se piensa, la aparición evolutiva del DNA como material genético celular tuvo que ser, al menos en parte, producto de la aparición en el replisoma de un mecanismo que regulara y canalizara la concentración local de los sustratos y cofactores necesarios (desoxirribonucleótidos y Mg^{++}) para su síntesis correcta, ya que si en la vecindad de la polimerasa se encuentran ribonucleótidos o análogos de nucleótidos, u otro cofactor (como el Mn^{++}), éstos serían incorporados por la polimerasa en las nuevas cadenas de DNA.

Si las polimerasas ancestrales podían aceptar otros sustratos, cofactores y moldes, como ocurre con las polimerasas actuales (Tablas 1-4), la aparición evolutiva de estos mecanismos fue sesgando la catálisis de estas enzimas hacia un solo tipo de evento catalítico (en el caso de las DNA polimerasas, hacia la síntesis de cadenas de DNA), y por lo tanto fue disminuyendo el fondo de reacciones fortuitas que la polimerasa ancestral realizaba, dada su baja especificidad enzimática.

Así pues, en la evolución de la catálisis que realizan las polimerasas se pueden reconocer dos procesos: 1) el cambio en la secuencia primaria misma de las polimerasas hacia formas más específicas en cuanto al molde y sustrato que utilizan; y, sobre todo, 2) la adición de subunidades reguladoras a los péptidos catalíticos originales, que elevan las concentraciones de los sustratos y cofactores correctos canalizándolos para que se realice la síntesis del ácido nucleico en cuestión. Ello sugiere que debe existir un mecanismo, aún no estudiado, que controle a su vez las concentraciones locales del metal divalente adecuado para que funcione la polimerasa encargada de dicha labor.

Es decir, nosotros sugerimos que aunque durante la evolución de las polimerasas las subunidades catalíticas ancestrales incrementaron su especificidad, la especialización de cada polimerasa en una reacción particular se debió sobre todo a la adición de subunidades reguladoras que llevaron a la formación de complejos multienzimáticos que, en conjunto, fueron sesgando la catálisis hacia la reacción deseada. Esto es, también hubo una evolución estructural que permitiera formar estos complejos.

Así, la evolución del replisoma se debe ver como un todo que adquirió mecanismos metabólicos que permiten regular con precisión los factores clave para determinar qué tipo de molde, RNA o DNA, y sustrato, rNTPs o dNTPs, usaría cada polimerasa mejorando así la fidelidad de la replicación y transcripción. Estos dos mecanismos son: a) los que permiten regular una concentración local elevada del tipo de nucleótido adecuado en la vecindad inmediata de la polimerasa, y b) el tipo de metal divalente que se usa como cofactor, y su concentración adecuada, en el replisoma durante la síntesis de un polinucleótido; sin embargo, aún se ignora qué mecanismos celulares existen para controlar

Tabla 6. Reportes de la actividad enzimática de la reverso transcriptasa del virus de la mieloblastosis de ave.*

ION Y [] ACTIVIDAD	USADA OBSERVACIONES	MOLDE	CONDICIONES DE ENSAYO	REFERENCIA	MAXIMA
REPORTADA					
Mn ⁺⁺ 0.6 mM Se usó después de	Poli (A)		90 min. incubación, Gregerson, 25 °C, pH 8.3, 120 mM et al., NaCl, 1 μCi 3H (0.02 1979. μM dTTP).		1950 cpm
8 meses de almace- namiento.					
Mn ⁺⁺ 0.6 mM " "	Poli (Cm) " "		" "		432 cpm
Mg ⁺⁺ 6 mM " "	Poli (A) " "		" "		2340 cpm
Mg ⁺⁺ 6 mM " "	Poli (Cm) " "		" "		549 cpm
Mg ⁺⁺ y Mn ⁺⁺ " " y 6 mM y 0.6 mM	Poli (A) " "		" "		-----
Mg ⁺⁺ y Mn ⁺⁺ " " y 6 mM y 0.6 mM	Poli (Cm) " "		" "		-----
Mn ⁺⁺ 2 mM pmol et al., 1970.	Poli (A,U)		30 min. incubación, Scolnick 37 °C, pH 7.8, 60 mM KCl, 20 μM 3H.		8.15
Mg ⁺⁺ 10 mM pmol	Poli (A,U)		" "		0.08
Mg ⁺⁺ 100 mM La presencia de Mn ⁺⁺ incre- menta la eficiencia del Poli (A)-Poli (U) como molde. En ausencia de homopolímeros	?		30 min. incubación, 38 °C pH 8.0, 50 mM KCl, 0.1 mM 3H		

complementarios no hubo actividad bajo estas condiciones.

Mg⁺⁺ 0.5 μM RNA total 30 min. incubación, 31.4 pmol
Sólo se usaron moldes naturales. En presencia de ribonucleasas, la actividad máxima

Hurwitz
de AMV 38 °C, pH 8.2, 0.25
y Leis,
μM KCl, 1 nmol 3H.
1972.

se obtuvo con Mn⁺⁺.

Mg⁺⁺ y Mn⁺⁺ RNA total " " 1.66 pmol
" " " " " " " "
10 mM y de AMV
1 mM
(óptimos)

Mg⁺⁺ y Mn⁺⁺ RNA de f2 " " 43.5 pmol
" " " " " " " "
0.5 mM y
0.2 mM

* -Las condiciones de ensayo, en cuanto al tipo y cantidad de molde, enzima y 3H usado, cambian en cada reporte. Los valores anotados son los máximos de actividad para cada tipo de experimento.

-Con Mg⁺⁺, Mn⁺⁺, y Mg⁺⁺ y Mn⁺⁺ juntos siempre hubo actividad de reverso transcripción.

-Fueron muy pocos los experimentos con Mn⁺⁺ sólo. Se hicieron más ensayos con Mg⁺⁺ sólo, y luego con Mg⁺⁺ y Mn⁺⁺ juntos.

-En estos reportes no se hicieron experimentos para buscar las concentraciones óptimas para cada ion (o de ambos), y ver así con cuál es más eficiente la enzima.

los niveles locales del metal necesario para cada tipo de enzima. La pregunta al respecto queda abierta.

Esta hipótesis se ve apoyada por cuatro evidencias directas que provienen de la síntesis actual de los ácidos nucleicos:

1) La falta de especificidad de las polimerasas actuales.

a) Los resultados de los experimentos realizados en esta tesis, en los que demostramos que el fragmento Klenow es una enzima flexible que puede aceptar ribonucleótidos como sustrato.

b) La abrumadora cantidad de ejemplos, enlistados en las Tablas 1-4, que demuestran la facilidad con la que una misma polimerasa puede aceptar alternativamente diferentes tipos de moldes de RNA y de DNA, de nucleótidos usuales, naturales y sintéticos (por ejemplo, poli rA-C, poli dT), así como la posibilidad de utilizar dNTPs o rNTPs como sustrato, ya sea por separado, o en la síntesis de una misma cadena de un ácido nucleico.

c) Existe una lista enorme de ejemplos de que las diferentes polimerasas pueden aceptar una variedad enorme de polímeros como molde, análogos del RNA y DNA; por ejemplo: poli mG, poli I, poli N-metil U, poli tiol U, poli fluorouracilo, etc. (Krakow y Ochoa, 1963; Walker y DeClercq, 1979; Kornberg, 1980), así como análogos de nucleótidos como sustrato (como el bromouracilo, la inosina, el AZT y la 3-metil guanocina) (Walker y DeClercq, 1979; Kornberg, 1980; Kunz, 1982)

2) El uso de Mg⁺⁺ como cofactor en todas las DNA polimerasas

Sabemos que todas las polimerasas pueden ser activadas por distintos metales divalentes, como el Cd⁺⁺, Fe⁺⁺, Mn⁺⁺, Cu⁺⁺, Co⁺⁺, Be⁺⁺, etc. (Kornberg, 1980; Loeb Zakour, 1980; Mildvan y Loeb, 1981, Loeb y Mildvan, 1981), pero, al menos, todas las DNA polimerasas, tanto celulares como virales, que de todas las polimerasas son las que tienen la menor tasa de error (Loeb y Zakour, 1980; Loeb y Mildvan, 1981; Mildvan y Loeb, 1981), usan preferencialmente el Mg⁺⁺.

De los metales divalentes que pueden activar a las polimerasas, el que provoca mayor fidelidad de copiado al aumentar la especificidad de las polimerasas es el Mg⁺⁺ (Kornberg, 1980; Loeb y Zakour, 1980; Mildvan y Loeb, 1981; Loeb & Mildvan, 1981; Watson et al., 1987; Lewin, 1990). Gracias a los estudios de mediciones de los cambios en la intensidad de la rotación óptica en el rango de la luz ultra violeta, se sabe que este efecto se debe tanto al aumento en la estabilidad de la estructura helicoidal, como en el apilamiento de las bases al unirse a los radicales fosfato del polinucleótido que provoca el Mg⁺⁺, probablemente por su fuerte afinidad por los iones fosfato debido a su valencia, y que estabiliza la formación del dúplex entre los monómeros y el molde con mayor eficiencia que otros cationes (Shin, 1973).

3) La ubicación en el complejo replicativo de la ribonucleótido reductasa.

La ribonucleótido reductasa es la enzima que reduce los ribonucleótidos a desoxirribonucleótidos para la síntesis de DNA (ver Figura 7). Aunque su ubicación celular no se conoce con precisión (Holmgren, 1989), las evidencias que sugieren fuertemente que esta enzima se encuentra directamente unida al replisoma, regulando los niveles locales de los dNTPs tanto en el lugar como en el momento: precisos de la síntesis del DNA, son las siguientes:

a) La línea mutante de *E. coli* EA101 es incapaz de replicar su DNA a 42°C, ya que tiene una mutación en la subunidad B1 de la ribonucleótido reductasa que la vuelve termolábil a esta temperatura (Wechsler y Gross, 1971). Sin embargo, Manwaring y Fuchs (1979) encontraron que las pozas totales de dNTPs de esta clona no disminuían después del choque térmico (que inactiva la ribonucleótido reductasa) y, a pesar de ello, no había síntesis de DNA. Estos autores apuntan que sus resultados pueden deberse a que las pozas de los sustratos de DNA inmediatamente disponibles en la horquilla de replicación (y localizados cerca de ella) podrían estar siendo abatidos fuertemente, sin afectar inmediatamente su concentración celular total. Es decir, esta enzima estaría suministrando localmente la cantidad necesaria de dNTPs a la polimerasa para que se sintetizen las nuevas cadenas de DNA.

b) Varios virus de DNA, cuya replicación cuando no se encuentran como provirus se realiza en el citoplasma de las células que infectan, codifican para su propia ribonucleótido reductasa. Tal es el caso de los poxivirus (Thelander y Reichard, 1979), los bacteriófagos T2, T4, T5 y T6 (Holmgren, 1981), y el virus del herpes simplex (Daikoku et al., 1991). Esto sugiere que estas entidades tienen que regular localmente los niveles de sustratos (dNTPs) necesarios para la replicación en el citoplasma de su genoma, justo en el momento de la infección, lo que logran sin ser integrados al genoma del hospedero portando su propia ribonucleótido reductasa. Asimismo, el colifago T7 codifica para su DNA polimerasa monomérica de 80 kD la cual, durante la infección, se une a la tiorredoxina (de 12 kD) del hospedero (Kornberg, 1988; Holmgren, 1989) y produce "por mecanismos aún oscuros una replicación rápida y procesiva" (Kornberg, 1988). Otros virus como el fago T4 codifican para su propia tiorredoxina. Así, es evidente que también los sistemas reductores como la tiorredoxina deben encontrarse muy cerca del complejo replicativo ya que la actividad de la ribonucleótido reductasa depende de dichas enzimas.

c) Reedy y Pardee (1980) demostraron que durante la fase de síntesis de DNA (fase S) en fibroblastos de embrión de hamster, tres de las enzimas involucradas en la síntesis de los precursores de los dNTPs (la ribonucleótido reductasa, la timidilato sintetasa, y la timidina cinasa) migran del citoplasma hacia el núcleo y, junto con la DNA polimerasa, se agregan en la horquilla de replicación formando un complejo multienzimático. Reedy y Pardee (1980)

también demostraron que es la ribonucleótido reductasa la que directamente le suministra el sustrato (dNTPs) a la DNA polimerasas, justo en el momento de la síntesis del DNA. A partir de estos hallazgos, Reedy y Pardee (1980) sugirieron que este complejo multienzimático está regulando, mediante la canalización, el tipo y la cantidad de sustrato adecuados hacia el sitio activo de la polimerasa; el mismo tipo de agregados multienzimáticos para la síntesis de los precursores del DNA se han observado en el replisoma de otras células, que estarían cumpliendo esta misma función reguladora y canalización de sustrato para la síntesis de DNA.

d) Kuebbing y Werner (1975) encuentran que en células HeLa las pozas de timidina son más altas cerca de la horquilla de replicación.

e) Trabajando con E. coli, Pato (1979) reporta también un gradiente de las concentraciones de dTTP, cuyo mayor nivel se encuentra cerca de la horquilla de replicación, y apunta que la mejor explicación para sus datos es "la existencia de una compartimentalización funcional de los dNTPs" y una "intrigante alternativa", para que tal fenómeno suceda es que las enzimas responsables de la síntesis de los dNTPs y de la replicación del DNA formen un complejo multienzimático que canalicen los precursores hacia el sitio de la síntesis del DNA. Explicaciones similares de compartimentalización en el sitio de replicación del DNA del fago T4, provocados por éste después de infectar a E. coli, han surgido del trabajo de Reddy et al. (1977) y Worcha et al. (1976).

f) Reddy y Mathews (1978) encontraron una concentración 50 veces más elevada de dNTPs cerca de la horquilla de replicación durante la síntesis del DNA del fago T4. A su vez, aislaron un complejo multienzimático que contiene al menos cuatro proteínas codificadas por el fago (la dTMP sintetasa, dCMP desaminasa, dNMP cinasa, dCTPasa-dUTPasa, y la dCMP hidroximetilasa) más una del hospedero (la nucleósido difosfocinasa) después de infectar a E. coli; todas ellas participan en la biosíntesis de los dNTPs. Ellos proponen que este complejo está canalizando los dNTPs directamente a la DNA polimerasa durante la replicación del DNA del fago T4 y, por lo tanto, pertenecen al complejo replicativo.

g) Existen otras evidencias que sugieren que la ribonucleótido reductasa forma parte del replisoma: Mun y Mathews (1991) encontraron que el aumento de las pozas intranucleares de dNTPs está sincronizado con la fase S en las células de hamster chino, a pesar de la naturaleza porosa de la membrana nuclear. Ellos apuntan que debe haber condiciones bajo las cuales la distribución de los dNTPs a ambos lados de esta membrana no son al azar (Mun y Mathews, 1991). A su vez, Daikoku et al. (1991) observó que durante la infección de las células Vero por viriones del herpes simplex, que codifican su propia ribonucleótido reductasa, la poza intracelular de dNTPs aumenta significativamente en

comparación con las células control no infectadas; por contraste, dichas pozas se abatieron al añadirle hidroxiaurea, un inhibidor específico para la ribonucleótido reductasa.

Por lo tanto, es muy probable que en los procariontes este mismo tipo de agregado (que incluyen al menos a la ribonucleótido reductasa y a las nucleótido cinasas) se encuentra directamente asociado a la DNA polimerasa proveyendo tanto de sustrato como regulando sus niveles locales para lograr la síntesis del DNA. Es decir, que estas enzimas son parte del replisoma mismo.

4) La baja tasa de error no está determinada del todo por la actividad correctora 3'→5'. La determinación de la tasa de incorporación errónea de nucleótidos no complementarios por la DNA polimerasa I de *E. coli*, y varias RNA polimerasas (Tabla 7) llevadas a cabo por Loeb et al. (1978) y Agarwal et al. (1979), demuestran que en todos los casos la incorporación de nucleótidos correctos e incorrectos fue lineal con el tiempo de incubación y proporcional a la concentración de la enzima, pero que también fue directamente proporcional a la concentración de nucleótidos no complementarios. Los resultados de Loeb et al. (1979) y de Agarwal et al. (1979) muestran que distintas polimerasas copian el mismo molde con distinta fidelidad, pero también que, al menos para las enzimas que analizaron, las tasas de error de las DNA polimerasas, la DNA polimerasa I de *E. coli* y la del fago T4, que poseen actividad de exonucleasa 3'→5', son similares a las tasas de error de algunas DNA y RNA polimerasas que no poseen esta actividad correctora (Tabla 7).

Aunque se han reportado distintos valores para la tasa de error de la RNA polimerasa de *E. coli*, sólo los resultados obtenidos por Blank et al. (1986) y por Springgate y Loeb (1975) son consistentes con los valores reportados in vivo por Loftfield y Vanderjagt (1972), Edelman y Gallant (1977), y Ellis y Gallant (1982) para la tasa de incorporación errónea de aminoácidos en las proteínas, que es de 10-40/100 000; Libby y Gallant (1991) sugieren que por lo tanto los valores de Blank et al. (1986) y Springgate y Loeb (1975) sean aceptados como los más aproximados a las tasas de error in vivo de estas enzimas, ya que el número de errores producidos durante la transcripción por la RNA polimerasa debe ser menor a la frecuencia con la que se encuentran aminoácidos mal incorporados en las proteínas, dado que en este último valor deben estar también considerados los errores cometidos por el aparato traduccional. Aparte de esto, no todas las DNA polimerasas procariontes poseen actividad correctora, como la DNA polimerasa III de *B. subtilis* (Low et al., 1976), y para las diferentes DNA polimerasas eucariontes, tampoco se ha demostrado que posean ninguna actividad correctora que sea intrínseca de la enzima (Weissbach, 1977; Kornberg, 1980). Es decir, se puede concluir que la actividad

Tabla 7. Tasas de incorporación errónea de nucleótidos no complementarios de distintas polimerasas.*

DNA POLIMERASA	MOLDE	NUCLEOTIDO NO COMPLEMENTARIO	TASA DE ERROR	
I, E. coli		Poli d(A-T)	dGTP	1/70 000
Fago T4		Poli d(A-T)	dCTP	1/12 000 ^Y
Á nuclear de erizo de mar		Poli d(A-T)	dGTP	1/12 000
Á nuclear de placenta humana		Poli d(A-T)	dGTP	1/9 000
Á de linfocitos humanos		Poli d(A-T)	dGTP	1/14 000
Á de timo de ternera		Poli d(A-T)	dGTP	1/9 000
β de placenta humana		Poli d(A-T)	dGTP	1/14 000
β de timo de ternera		Poli d(A-T)	dGTP	1/30 000
RNA POLIMERASA				
E. coli		Poli d(A-T)	dCTP	1/2 400
E. coli		Poli d(A-T)	dGTP	1/42 000 ^f
REVERSO TRANSCRIPTASA				
AMV		Poli (A) ·oligo d(T)	dCTP	1/800
AMV		Poli d(A-T)	dGTP	1/3 000
ASV		Poli (C) ·oligo d(G)	dATP	1/900

* Modificado de Loeb y Zakour, 1980.

^Y Para esta misma enzima, Hall & Lehman (1968), y Battula y Loeb (1974), encontraron que la tasa de error, in vitro, es 1/10 000, usando el mismo molde y nucleótido no complementario.

^f Sin embargo, para esta misma enzima, Blank et al. (1986), y Springgate y Loeb, (1975), encontraron que la tasa de error, in vitro, es de 1-2/100 000, usando este mismo

molde y nucleótido no complementario, valor que es muy parecido al de la DNA polimerasa I de E. coli de esta misma tabla.

Abreviaciones: AMV, virus de la mieloblastosis de ave;
ASV, virus del sarcoma de ave.

correctora de exonucleasa no es la principal determinante en la fidelidad de replicación por las DNA polimerasas (Loeb y Zakour, 1980; Loeb et al., 1981), ya que la tasa de error de estas enzimas no es tan diferente, en todos los casos, de la de polimerasas que no poseen dicha actividad correctora, y que la fidelidad final de copiado es el resultado del complejo multienzimático que debe estar asociado a la holoenzima.

Dado que la actividad correctora 5'→3' y 3'→5' de las DNA polimerasas procariontes no juega un papel predominante en la alta fidelidad de copiado del DNA (Loeb y Zakour, 1980; Loeb et al, 1981), y debido a que las DNA polimerasas eucariontes no poseen intrínsecamente estas actividades correctoras, es posible que las capacidades editoras existan en los polipéptidos independientes a las subunidades catalíticas (Goodman y Branscomb, 1986), pero estas otras subunidades deben entonces pertenecer a la polimerasa holoenzima o hallarse cerca de ella. Al respecto, Scheuermann y Echols (1984) demostraron que la actividad de exonucleasa 3'→5' de la DNA polimerasa III de *E. coli* se encuentra en la subunidad \bar{Y} , físicamente separada del centro catalítico (la subunidad \bar{A}), que carece de toda actividad correctora intrínseca. A su vez, esta holoenzima también presenta una actividad editora 5'→3', pero también se halla en un péptido diferente, aunque no se sabe con precisión cuál es (McMacken et al, 1987).

Es por eso que podemos pensar que las funciones de edición, aunque no se haya descubierto para la mayoría de las DNA polimerasas eucariontes y procariontes, están presentes en subunidades separadas, funcionalmente unidas a la holoenzima en cada caso; es decir, que haya subunidades homólogas o análogas a la subunidad \bar{Y} en las demás polimerasas eucariontes y procariontes (Goodman y Branscomb, 1986). En la DNA polimerasa III de *B. subtilis* se sabe que la actividad de exonucleasa no se encuentra en el péptido catalítico (Low et al., 1976). El mismo hecho parece suceder en la DNA polimerasa I de *Mycoplasma* sp. y tal vez en todo el linaje de las bacterias Gram positivas.

Se sabe también que el desbalanceo en las concentraciones locales de rNTPs provoca la incorporación errónea de bases durante la transcripción por las RNA polimerasas (Libby y Gallant, 1991). Así, algunos polipéptidos que forman las diferentes RNA polimerasas, cuya función exacta aun no se conoce (Woichik y Young, 1990), podrían estar funcionando para regular los niveles locales de rNTPs, y por lo tanto aumentando la fidelidad y eficiencia de la transcripción (Sweetser et al, 1987; Woichik y Young, 1990). Al respecto, se sabe que existe una actividad correctora en la transcripción. Volloch et al. (1979) reportaron que hay un péptido con actividad de NTPasa asociada a la RNA polimerasa de *E. coli*.

Aunque no se ha demostrado una relación funcional in vivo directa entre esta NTPasa y la RNA polimerasas (Libby y Gallant, 1991), Libby et al. (1989) demostraron que en *E.*

coli hay una relación genética entre la actividad de NTPasa (cuya actividad era dependiente de molde) y la subunidad β de la RNA polimerasa, por un lado, y la exactitud de la transcripción, por el otro. En sus experimentos, Libby et al. (1989) aislaron una RNA polimerasa mutante para la subunidad β que mostraba una reducida exactitud transcripcional, y que a su vez carecía de la actividad de NTPasa dependiente de molde. Así, en este caso, un péptido adicional a las subunidades catalíticas de la RNA polimerasa está aumentando la fidelidad de síntesis del RNA. Se puede predecir, por lo tanto, que existan casos similares en otras RNA polimerasas, y que posiblemente ya existieran indicios de actividades correctoras en péptidos que se unían a las RNA replicasas ancestrales.

Aparte de los factores de transcripción, que promueven la especificidad por los diferentes promotores y por las diferentes señales genéticas inscritas en las secuencias del DNA para regular la tasa y expresión diferencial de los genes, dichas funciones podrían ser de dos maneras: controlando, al igual que en el caso de las DNA polimerasas (como se ha discutido a lo largo de este trabajo), los niveles locales de rNTPS (Libby y Gallant, 1991), o provocando la escisión de las bases malincorporadas (Anderson y Manninger, 1986).

Un ejemplo de que son los péptidos accesorios, pero separados, los que en conjunto aumentan la fidelidad y tasa de síntesis de un ácido nucleico lo constituyen las subunidades β y gama de la DNA polimerasa Λ de *Drosophila*, quienes aumentan varios órdenes de magnitud la tasa de síntesis, mientras que la subunidad Λ es el centro catalítico (Hübscher, 1984). El fenómeno es idéntico en el caso de la subunidad β , de la DNA polimerasa III de *E. coli*, al unirse al centro catalítico Λ de esta enzima (McMacken et al, 1987).

Otro ejemplo claro lo constituye la primasa de *E. coli*, en la que se ha visto que la sola primasa (el producto del gen *dnaC*) lee su propio molde pobremente y cuando se le añaden in vitro los demás componentes del complejo (que consta de más de 18 péptidos), su actividad aumenta considerablemente (McMacken y Kornberg, 1978). Asimismo, la primasa sola lee muy ineficientemente otros moldes, y aún más pobremente si tiene asociado el complejo entero (McMacken y Kornberg, 1978). Estos experimentos demuestran claramente que es el complejo enzimático que se agrega al centro catalítico el que confiere la especificidad por el molde y sustratos a la subunidad catalítica.

En el caso de la DNA polimerasa δ descubierta en timo de ternera, se sabe que su alta procesividad es fuertemente dependiente de un péptido accesorio, llamado antígeno nuclear celular proliferativo (PCNA), así como del factor de replicación C (RF-C) (Blow, 1989; Lin, 1991).

Estos mecanismos (péptidos separados) que aumentan la fidelidad y la tasa de síntesis (como la NTPasa de la RNA polimerasa de *E. coli*, las subunidades β y gama de la DNA

polimerasa de Drosophila mencionados arriba §) habrían evolucionado después de la aparición de los péptidos catalíticos originales, intrínsecamente poco eficientes y erróneos. Sin embargo, la DNA polimerasa γ , inicialmente descrita en levadura, es una enzima altamente procesiva que, hasta donde se sabe, no requiere de un factor adicional (Linn, 1991). Esto no descarta la posibilidad de que in vivo existan factores de replicación específicos para esta enzima.

Lo anterior apoya la hipótesis de que durante la transición evolutiva de genomas de RNA a genomas de DNA (Lazcano et al., 1988a) que el replisoma también evolucionó, adquiriendo subunidades reguladoras que en conjunto permitieron evitar la incorporación errónea de ribonucleótidos en las cadenas nuevas de DNA. Esta evolución implicó la adquisición de sistemas tanto de localización del cofactor adecuado y en sus concentraciones óptimas, como de reducción de los ribonucleótidos y mecanismos que regulan los niveles locales adecuados de nucleótidos en la vecindad inmediata de la DNA polimerasa (como muy posiblemente lo haga la ribonucleótido reductasa), elevando la concentración local de dNTPs y abatiendo drásticamente la de rNTPs, a fin de que estos últimos no sean utilizados como sustrato por la DNA polimerasa.

Por lo tanto, si la ribonucleótido reductasa se encuentra directamente asociada al replisoma, y las DNA polimerasas son flexibles catalíticamente, como se ha argumentado a lo largo de este trabajo, la inactivación de la primera debe provocar, in vivo, la incorporación de ribonucleótidos en las nuevas cadenas de DNA por la DNA polimerasa. Al respecto, estudios hechos por Cory (1988) con células tumorales de hígado de rata para tratar de inhibir su proliferación demostraron que, antes de que murieran estas células cancerosas, se dio la incorporación de rNTPs en la nueva cadena de DNA. Cory (1988) trató a las células durante la fase S con 14C-rCTP y después con HAG-IQ, un inhibidor específico para la ribonucleótido reductasa. Una vez que esta enzima se inactivara, pero antes de que la células murieran, observó que en las nuevas cadenas de DNA había rCTP marcado, aunque la tasa de síntesis cesó rápidamente, mientras que la tasa de síntesis de RNA no fue afectada por la inactivación con HAG-IQ.

Así, estos estudios pueden explicar la existencia del complejo multienzimático que se forma justo durante la síntesis del DNA, que contendría la ribonucleótido reductasa, y que fue descubierto por Reddy y Pardee (1980). Ellos demostraron que existe una compartimentalización y canalización de los sustratos para asegurar un tipo de evento catalítico particular en una dirección dada. Contrario a la concepción que actualmente se tiene del replisoma (Figura 8), proponemos que éste debe ser visto como un complejo enzimático del que forman parte la ribonucleótido reductasa y las nucleótido cinasas. Es por eso que proponemos que la definición del replisoma se debe

ampliar para incluir la existencia de dichos complejos multienzimáticos (Figura 9).

Estos mecanismos de regulación de los niveles locales de rNTPs y dNTPs y del cofactor necesario en cada caso, también debe existir por lo tanto en las RNA polimerasas DNA dependientes, reverso transcriptasas y RNA replicasas, aunque no se conocen aún para todas las enzimas. Sin embargo, las RNA polimerasas y las RNA replicasas no precisan poseer los mecanismos necesarios para controlar las concentraciones de dNTPs, mecanismos que sí son requeridos por las DNA polimerasas. Esto se debe a que no necesitan tener un suministro local alto y controlado de su sustrato (ribonucleótidos) ya que, a diferencia de los desoxirribonucleótidos (que sólo se requieren para la síntesis de DNA), estos son un componente continuo y abundante de la célula debido a su utilización en todas las rutas metabólicas celulares.

Así, la ribonucleótido reductasa, junto con los sistemas enzimáticos que le suministran el poder reductor (tioredoxina, glutaredoxina), habrían aparecido antes y como un requisito sine qua non a la aparición de las DNA polimerasas y de los genomas de DNA (Lazcano et al., 1992b).

Sin embargo, los sistemas que suministran el poder reductor (tioredoxina y glutaredoxina) a la ribonucleótido reductasa no son el factor limitante para el funcionamiento de esta enzima, ya que hay mutantes viables que carecen totalmente de ambos sistemas, lo que implica que hay otros tipos de sistemas reductores aún no conocidos para esta enzima (Cory, 1988; Holmgren, 1989).

A su vez, dado que la ribonucleótido reductasa se encuentra regulada alostéricamente de manera altamente específica por sus sustratos y por dichos sistemas reductores (al menos esto es válido para las subunidades B1 que poseen parte del sitio catalítico, así como todos los sitios alostéricos) (Thelander y Reichard, 1979; Kornberg, 1980; Holmgren, 1981, 1989), tal vez esta enzima es una molécula que evolutivamente apareció posteriormente a dichos sistemas reductores, producto de una serie de cambios evolutivos mucho más complejo y cuya aparición permitió la síntesis muy precisa de los dNTPs. Así, antes de que esta enzima apareciera, ya habría reducción de ribonucleótidos (y tal vez síntesis de DNA) por medio de otros sistemas reductores de función más general ya presentes en las células como la glutaredoxina o la tioredoxina mismas, que poseían los dominios que contienen el sitio redox. Después el dominio responsable de portar los grupos -SH de estos sistemas reductores evolucionó produciendo la subunidad B1 de la ribonucleótido reductasa. Esta posibilidad es plausible, porque la tioredoxina de mamíferos es homóloga a la de *E. coli*, siendo la secuencia del centro activo -Cys-Gly-Pro-Cys- idéntica entre ellas (Holmgren, 1980). Además, hay una reactividad cruzada general entre las tioredoxinas de mamífero y de *E. coli* y la ribonucleótido reductasa (Luthman et al, 1979). Aparte de esto, existe un par de

cisteínas, pertenecientes al sitio redox, que se encuentran en una secuencia altamente conservada en todas las disulfuro oxidorreductasas (Brown et al., 1989).

Por otra parte, dado que la mercurio reductasa de *Pseudomonas aeruginosa* muestra una alta similitud en su región N-terminal (que posee el sitio redox) con la región que tiene el sitio redox de la proteína Mer-P del mismo organismo, Brown et al (1989) afirma que esto indica que la región N-terminal de la mercurio reductasa debe haber surgido por duplicación y fusión del gen de merP con el gen que codificaba para una reductasa ancestral, que poseía el sitio redox presente en todas las oxidorreductasas actuales.

Este es un caso general para al menos seis flavoprotein oxidorreductasas (la glutatión reductasa, la tripanotión reductasa, la lipoamida deshidrogenasa, la tiorredoxin reductasa, la mercurio reductasa y la NADH peroxidasa), en donde los dominios que unen al NADPH son muy similares a los que unen al FAD. Ello sugiere que estos dominios surgieron por duplicación genética de uno ancestral, y posteriormente se diversificaron por acreción y adquisición de distintos módulos para originar las diferentes oxidorreductasas dependientes de NADPH o de FAD (Petsko, 1991)

Así, esta misma oxidorreductasa ancestral pudo haber sido la fuente del poder reductor para la síntesis de desoxirribonucleótidos, antes de la aparición de las subunidades alostéricas que actualmente poseen las ribonucleótido reductasas, cuyo dominio, por duplicación y fusión con otros genes, como en el caso que sugiere Brown et al. (1989), después llegó a formar a la ribonucleótido reductasa actual.

Si la subunidad B1 de la ribonucleótido reductasa es altamente específica para sus reguladores alostéricos (que son sus sustratos), y las polimerasas son menos específicas que esta, entonces las polimerasas pueden ser más antiguas que esta subunidad.

En breve: proponemos que con la aparición del DNA surgieron, por un lado, mecanismos correctores (actividad de edición 3'→5' y 5'→3') en algunas DNA polimerasas, que limitan la incorporación de nucleótidos no complementarios (i.e. bases mal apareadas) y, por otro lado, mecanismos reductores que regulan y canalizan la concentración local de dNTPs, evitando la incorporación de ribonucleótidos durante la síntesis de las nuevas cadenas del DNA.

VI. DISCUSION Y CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten concluir que el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* es flexible enzimáticamente en lo que al sustrato y cofactor se refiere. Es decir, puede catalizar la síntesis de cadenas de DNA, RNA o de copolímeros de dNTPs-rNTPs unidos covalentemente utilizando como cofactor Mn^{++} o Mg^{++} .

Esta enzima incorpora ribonucleótidos en las condiciones naturales de actividad, es decir, en presencia de 10 mM de Mg^{++} (Fig. 4). Con Mn^{++} también incorpora rCTP (Fig. 4 y 5); Así, esta enzima funciona como una RNA polimerasa. En presencia de 1.5 mM de Mn^{++} la incorporación de rCTP es cuatro veces más alta que con la concentración óptima de Mg^{++} (10 mM). Sin embargo, la máxima incorporación de rCTP se observó en presencia de 1.5 mM de Mn^{++} y 0.1 mM de Mg^{++} .

En presencia de DNA total de timo de ternera y en ausencia total de dNTPs no marcados (Fig. 2), se observó la máxima incorporación de dATP marcado. El mismo fenómeno ocurrió en presencia únicamente de rCTP marcado como sustrato (Fig. 3). Esto indica que la enzima está sintetizando cadenas de poli A, o poli C, según el caso, tomando como molde únicamente regiones ricas en timina o guanina, respectivamente. Alternativamente, la enzima está leyendo el molde sin reconocer las bases.

A su vez, en presencia de 1.5 mM de Mn^{++} y 0.1 mM de Mg^{++} , cuando estaban presentes al mismo tiempo dCTP y rCTP esta enzima los incorporó en la misma cadena, sintetizando así cadenas mixtas de ambos tipos de nucleótidos (Fig. 6). En la Tabla 8 se resume la tasa de incorporación de rCTP con respecto a la de dCTP.

Tabla 8. tasa de incorporación de rCTP y dCTP por el fragmento Klenow.

r+d NTPs (μ M)	Proporción r:d	
	1:1	4:1
0.5	1/1000	1/170
0.05	1/400	1/170

Estos resultados muestran claramente la flexibilidad intrínseca de esta enzima, y son consecuentes con otros valores obtenidos por diferentes autores, en cuanto a la gran capacidad de las polimerasas para incorporar rNTPs y dNTPs en una misma hebra, tanto in vivo (Tabla 9) como in vitro (Tabla 10). Las diferencias en los valores que particularmente obtiene cada investigador se deben a las condiciones particulares de ensayo empleadas y a la enzima analizada, que en cada caso son diferentes.

TABLA 9. Cuantificación de las tasas de error observadas in vivo por diferentes polimerasas.

ENZIMA	ACTIVIDAD ANOMALA	TASA DE ERROR	REFERENCIA
?	Síntesis de hebras de dNTPs-rNTPs	95% es RNA y 5% es DNA	Buckley et al., (1972).
?	Formación de hebras (-) de RNA	1 (-)/200 (+)	Stavnezer et al., 1976.
RT del virus del sarcoma de murino	Formación de hebras (-) de RNA	1.1 % de las hebras son (-).	Knesek et al., 1980.
RT del Virus de la necrosis de ave	Síntesis de hebras de dNTPs-rNTPs	>10 % es RNA en segmentos de 1-3 rNTPs	Chen y Temin, 1980.

Tabla 10. Cuantificación de las tasas de error observadas in vitro por diferentes polimerasas.

ENZIMA	ACTIVIDAD ANOMALA	TASA DE ERROR	REFERENCIA
RNA polimerasa de M. luteus	Síntesis de hebras de dNTPs-rNTPs	3 rNTPs/2 dNTPs 5 rUTP/1 dATP	Chen y T'so, 1965.
DNA polimerasa I de E. coli	Síntesis de hebras de dNTPs-rNTPs	Con Mn++, 1 rCTP/1 dCTP. Con Mg++, 1 rCTP/40 dCTP *	Berg et al., 1963.
DNA primasa de E. coli	Síntesis de hebras de dNTPs-rNTPs	1 rNTPs/2.5 dNTPs, 1 rNTP/1 dNTP, si están en prop. 125:40 *	McCacken y Kornberg, 1978.

* Usando condiciones naturales de ensayo.

El análisis teórico y experimental realizado en este trabajo nos permite concluir que las polimerasas, que pertenecen a una de las vías de síntesis más antigua, i.e., de los ácidos nucleicos, poseen una especificidad relativamente baja por el sustrato, lo que nos permite apoyar las ideas de Waley, Ycas y Jensen. Así, se puede interpretar su flexibilidad enzimática como un remanente histórico del estado metabólico en el que surgieron.

A su vez, en este trabajo se discute la posibilidad de que, dada la flexibilidad enzimática de las polimerasas, los resultados anómalos reportados en la literatura, en cuanto a la presencia de hebras de RNA (-) virales después de infectar a sus hospederos, así como genomas de DNA con segmentos de RNA, no se debe a que ello tenga una función específica en la célula como han sugerido los autores que los reportan, sino que su existencia se debe a errores que las polimerasas cometen al sintetizar un ácido nucleico, dada su baja especificidad (Lazcano et al., 1992c).

Por otro lado, a lo largo de este trabajo se ha discutido que, dada la flexibilidad enzimática de las DNA polimerasas, cuyos índices de error en cuanto a la incorporación de rNTPs se demuestran por los reportes de autores mencionados arriba (Tablas 1-4), así como los que se obtuvieron en este trabajo, proponemos que se incluya a la ribonucleótido reductasa y las nucleótido cinasas como parte del replisoma, formando así un complejo multienzimático que se estaría agregando alrededor de la DNA polimerasa o reverse transcriptasa. Estas enzimas estarían regulando la concentración local de los sustratos adecuados (dNTPs) durante la síntesis del DNA (ver Fig. 9).

Se ha propuesto un modelo del replisoma en el que se encuentran acopladas dos DNA polimerasas, éstas forman un complejo multienzimático con las DNA helicicasas, las DNA topoisomerasas, el primosoma, la ligasa, la girasa, las proteínas desestabilizadoras del DNA y más de 7 péptidos de menor peso molecular encargadas de la elongación, cuya función precisa aún no se conoce (Watson, et al., 1987).

En dicho modelo, el replisoma se halla anclado ya sea al nucleoesqueleto, o a la membrana en bacterias, fijo, y ambas cadenas del molde de DNA se desliza a través del replisoma para que este se pueda replicar. Aunque hay evidencias de que la síntesis del DNA se puede estar realizando de esta manera, hay evidencias teóricas y experimentales que pueden estar indicando que el replisoma tal vez no tenga esta estructura in vivo (Cook, 1991).

En todo caso, las consideraciones teóricas discutidas en este trabajo acerca de la adición de la ribonucleótido reductasas y las nucleótido cinasas al replisoma, se adecúan a este modelo, ya que también ellas podrían estar ancladas fijamente, muy cerca de las DNA polimerasas, y a medida que el DNA pasa a través del replisoma, éstas podrían estar "bombeando" el sustrato correcto a las DNA polimerasas.

En este esquema, dado que la ribonucleótido reductasa y las cinasas se encontrarían fijadas, con mayor facilidad

podrían estar regulando localmente las concentraciones de los sustratos.

Ello nos permite explicar que durante el momento de la síntesis, masiva o controlada, de los genomas de DNA viral foráneo durante una infección debe de existir en el replisoma la concentración local lo adecuadamente alta de desoxirribonucleótidos, y a su vez, debe abatirse en el mismo replisoma la concentración local de ribonucleótidos a fin de que no sean incorporados por la polimerasa en las nuevas cadenas de DNA. Ello ocurriría si la replicación del DNA viral se realicen en el núcleo, cuando están en forma de provirus, o en el citoplasma, como en el caso de los poxivirus, o de la reverso transcripción de los retrovirus.

Este tipo de agregados no son raros en la Naturaleza, y con la síntesis del DNA estaría pasando algo similar a lo que actualmente sucede con la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos en *Neurospora crassa*, en los que las enzimas involucradas en esta ruta metabólica se hallan formando un agregado multienzimático, que canaliza y regula localmente, y en momentos específicos del ciclo celular, los niveles de sustratos necesarios para que funcione dicha vía (Welch y Gaertner, 1975).

En este trabajo también se ha discutido la hipótesis de que durante la evolución celular tuvieron que haber evolucionado mecanismos que localmente abatieran los niveles del sustrato no deseado para que cada polimerasa no los incorporara, así como de mecanismos que elevaran y canalizaran la concentración local del cofactor (Mn^{++} o Mg^{++}) para producir en conjunto una fidelidad de copiado óptima, según el tipo de polímero que se esté sintetizando.

Así, lo que habría evolucionado es un conjunto multienzimático que se le fue adicionando a los péptidos catalíticos originales, como la adición de las nucleótido cinasas y la ribonucleótido reductasa a las DNA polimerasas, a fin de que estas sólo incorporen dNTPs durante la elongación del DNA. Esto es, lo que evolucionó fue el replisoma como un todo, y como un conjunto multienzimático funcional y regulatorio integral.

El tipo de catálisis que se fue produciendo en las polimerasas se fue adquiriendo en gran medida por el tipo de proteínas que fue conformando la holoenzima y se fue agregando al complejo replicativo, que hoy en día se zegan la catálisis hacia una reacción en particular y disminuyen y enmascaran las reacciones fortuitas que las polimerasas podrían realizar.

Al discutir nuestras conclusiones enmarcadas en la evolución del metabolismo en un sentido más amplio, sabemos que la regulación metabólica se da en dos niveles (Changeux y Blangy, 1981), que son: 1) la regulación de la producción de la cantidad de los catalizadores en la célula (es decir, regulación a nivel de la expresión genética, lo que implica la aparición de represores, secuencias reguladoras, operones, patrones diferenciales de metilación, superenrollamiento diferencial de regiones del DNA, etc.),

y 2) regulación del ritmo de la catálisis misma, es decir, regulación a nivel del funcionamiento de los catalizadores. De acuerdo con esta idea, en un siguiente estadio en la evolución del metabolismo (anterior a la aparición del último ancestro común a todas las formas de vida actuales), aparecerían estos diferentes mecanismos de la regulación metabólica.

En cuanto a la evolución de los mecanismos del segundo tipo, es decir, a la regulación del funcionamiento de los catalizadores mismos, debemos apuntar que se dio una evolución tanto en las subunidades catalíticas poco específicas ancestrales hacia formas más específicas y eficientes en cuanto a la aceptación de sustratos y cofactores, como el surgimiento de mecanismos reguladores (subunidades alostéricas) que fueron canalizando este tipo de catálisis ambigua (controlando tanto la dirección de las reacciones como la tasa de actividad catalítica), que a su vez fueron ocultando las diversas reacciones fortuitas, y disminuyendo el fondo de reacciones azarosas que las enzimas ancestrales podían realizar en las células.

De este modo, aparte del establecimiento de los mecanismos regulatorios a nivel genético que no son discutidos aquí, en cuanto a los sistemas enzimáticos, el estado metabólico de las células presentes tuvo que surgir a través de una especialización catalítica por un incremento en la especificidad enzimática, que se alcanzaría por tres procesos diferentes, que son: a) evolución de los péptidos catalíticos originales, por cambios en su secuencia, hacia formas con una gama de aceptación de sustratos y cofactores cada vez más estrecha, elevando así su especificidad enzimática intrínseca; b) aparición de subunidades alostéricas que se añadieron a los péptidos catalíticos ancestrales poco específicos, formando complejos multienzimáticos; c) aparición de los mecanismos de regulación alostérica en los puntos de entrada y de bifurcación de las vías metabólicas, que sezgan o desvían hacia una dirección específica el curso de una reacción a través de una secuencia de enzimas en particular.

A la luz de estas ideas, concluimos que la evolución de las polimerasas se dio en dos niveles, como un ejemplo del curso general que siguió la evolución temprana de las rutas metabólicas, que son: 1) cambio en la secuencia misma de los péptidos catalíticos originales hacia formas intrínsecamente más específicas, y 2) regulación de la catálisis hacia cierta dirección en particular debido a la aparición de subunidades alostéricas que se fueron añadiendo a las enzimas originales, formando complejos multienzimáticos y disminuyendo el fondo de reacciones azarosas debido a la baja especificidad de las enzimas ancestrales.

Así, la diversidad metabólica de las polimerasas hacia la síntesis y utilización como molde de diferentes ácidos nucleicos, así como el aumento en la fidelidad de copiado, se fue produciendo debido a que estos complejos multienzimáticos fueron regulando localmente tanto la

concentración como el tipo de sustrato y de cofactor adecuado, en cada caso, en la cercanía inmediata de la polimerasa.

Esta hipótesis se ve apoyada por diferentes evidencias de la síntesis actual de los ácidos nucleicos:

- a) La flexibilidad enzimática de las polimerasas actuales.
- b) La presencia de la ribonucleótido reductasa en el replisoma.
- c) La alta fidelidad de copiado de las DNA polimerasas no está dada totalmente por la actividad correctora 5'→3'.
- d) Las DNA polimerasas son las que poseen la menor tasa de error, y justamente ellas utilizan Mg⁺⁺ como cofactor, que es el catión que provoca la mayor fidelidad de síntesis.

La inexactitud en la transferencia de la información en las células ancestrales debido a la baja especificidad enzimática podría significar que los diferentes mecanismos de regulación bien afinados que existen en las células actuales no estuvieran desarrollados, es decir, que la red total de las rutas metabólicas y su precisa integración no existiría en las células ancestrales.

En esta fase evolutiva, las células podían poseer menos cistrones que las actuales, pero con tal vez igual complejidad metabólica que las células de hoy (Jensen, 1976). Existirían enzimas con baja especificidad por los sustratos y cofactores, que catalizan clases de reacciones, lo que provocaría un fondo grande de reacciones fortuitas erróneas en todas las rutas metabólicas.

Posteriormente se habría ido dando una integración paulatina de las diferentes vías metabólicas poco reguladas en un todo interdependiente altamente acoplado, debido a la evolución de los diferentes sistemas de regulación a nivel genético (Clase I) y enzimático (Clase II). En este estadio habrían parecido los interconectores alostéricos que regulan la actividad de los diversos circuitos metabólicos y de expresión genética.

Finalmente se produciría el estado metabólico actual de las células, originado por la divergencia funcional de las enzimas y formación de agregados enzimáticos coordinados que aumentaron la especificidad por el sustrato y cofactores de las enzimas ancestrales. Esta estructura metabólica actual también fue producto de la afinación de los sistemas que regulan, integran, corrigen y coordinan las diferentes vías metabólicas, así funcionando como un todo (la célula) y generando el mantenimiento y perpetuación de la identidad genética y metabólica. También se fueron enmascarando las amplias especificidades por los sustratos y cofactores de los péptidos ancestrales por los distintos mecanismos de regulación genética y enzimática, y disminución del fondo de reacciones fortuitas erróneas por dichos mecanismos.

VII. REFERENCIAS

- Adam, R. and Grossman, L. (1965). Action of the RNA polymerase on UV-irradiated poly-U. *Federation Proceedings* 24: 602
- Abrell, J. and Gallo, R. (1973). Purification, characterization, and comparison of the DNA polymerase from two primate RNA tumor viruses. *Journal of Virology* 12: 431-439.
- Agarwal, S., Dube, D. and Loeb, L. (1979). On fidelity of DNA replication. *Journal of Biological Chemistry* 254: 101-106.
- Alberts, B. (1986). The function of the hereditary materials: biological catalyses reflect the cell's evolutionary history. *American Zoologist* 26: 781-796.
- Alberts, B. (1990). Mechanisms and enzymology of DNA replication. En: F. Wu and C.-W. Wu (eds), *Structure and Function of Nucleic Acids and Proteins*. Raven Press. Ltd., New York, p. 223-237.
- Anderson, M. and Menninger, J. (1986). The accuracy of RNA synthesis. En: T. Kirkwood, R. Rosemberger and D. Galas (eds), *Accuracy in molecular processes*. Chapman and Hall, London, p. 159-189.
- Babiuk, L. and Rouse, B. (1976). Ribonucleotides in infectious bovine rhinotracheitis virus DNA. *Journal of General Virology* 31: 221-230.
- Ballard, P. and William-Ashman, H. (1965). Studies on a RNA polymerase purified from rat testis. *Federation Proceedings* 24: 602.
- Banks, G., Holloman, W., Kairis, M., Spanos, A. and Yarranton, G. (1976). A DNA polymerase from *Ustilago maydis*. *European Journal of Biochemistry* 62: 131-142.
- Banks, G. and Yarranton, G. (1976). A DNA polymerase from *Ustilago maydis*. *European Journal of Biochemistry* 62: 143-150.
- Battula, N. and Loeb, L. (1974). The infidelity of avian myeloblastosis virus deoxyribonucleic acid polymerase in polynucleotide replication. *Journal of Biological Chemistry* 249: 4086-4093.
- Bauer, G. and Hofschneider, P. (1976). An RNA-dependent DNA polymerase, different from the known viral reverse transcriptases, in the chicken system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 73: 3025-3029.

Bekkering-Kuylaars, S. and Campagnari, F. (1974). Characterization and properties of a DNA polymerase partially purified from the nuclei of calf thymus cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 349: 277-295.

Bekwith, J. (1987). The operon: an historical account. En: F. Neidhart, K. Low, B. Magasanik, M. Schaechter and H. Umbarger (eds), *Escherichia coli and Salmonella typhimurium* Vol. 2, American Society for Microbiology, Washington, D. C., p. 1439-1443.

Berg, P., Fancher, H. and Chamberlin, M. (1963). The synthesis of mixed polynucleotides containing ribo- and deoxyribonucleotides by purified preparations of DNA polymerase from *Escherichia coli*. En: H. Vogel, V. Bryson and J. Lampen (eds), *Informational Macromolecules* Academic Press, London, p. 467-483.

Bishop, J. and Levintow, L. (1971). Replicative forms of viral RNA. Structure and Function. *Progress in Medical Virology* 13: 1-82.

Biebricher, C. and Orgel, L. (1973). An RNA that multiplies indefinitely with DNA-dependent RNA polymerase: selection from a random copolymer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 70: 934-938.

Billeter, M., Weissman, C. and Warner, R. (1966). Replication of viral ribonucleic acid. *Journal of Molecular Biology* 17: 145-173.

Biswal, N. and Benyesh-Melnick, M. (1969). Complementary nuclear RNA's of Murine sarcoma-leukemia virus complex in transformed cells. *Biochemistry* 64: 1372-1379.

Blake, C. (1974). Evolution of nucleotide-binding proteins. *Nature* 250: 284-285

Blank, A., Gallant, J., Burgess, R. and Loeb, L. (1986). An RNA polymerase mutant with reduced accuracy of chain elongation. *Biochemistry* 25: 5920-5928.

Blow, J. (1989). Eukariotic chromosome replication requires both \bar{A} and \bar{S} DNA polymerases. *Trends in Genetics* 5: 134-136

Bolden, A., Fry, M., Muller, R., Citarella, R. and Weissbach, A. (1972). The presence of a polyriboadenylic acid-dependent DNA polymerase in eukaryotic cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 153: 26-33.

Branch, A., Benefield, B. and Robertson, H. (1988). Evidence for a single rolling circle in the replication of potato spindle tuber viroid. *Proceedings of the National Academy*

- Brown, N., Lund, P. and Nibhria, N. (1989). Mercury resistance in bacteria. En: D. Hopwood and K. Chater (eds), Genetics of Bacterial Diversity. Academic Press, London, p. 175-195.
- Buckley, P., Kosturko, L. and Kosinski, A. (1972). In vivo production of an RNA-DNA copolymer after infection of *Escherichia coli* by bacteriophage T4. Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A. 69: 3165-3169.
- Buzayan, J., Gerlach, W. and Bruening, G. (1986). Non-enzymatic cleavage and ligation of RNAs complementary to a plant virus satellite RNA. Nature 323: 349-353.
- Chamberlin, M. (1974). The selectivity of transcription. Annual Review of Biochemistry 43: 721-775.
- Chang, L. (1973). Low molecular weight deoxyribonucleic acid polymerase from calf thymus associated to chromatin. Journal of Biological Chemistry 248: 3789-3798.
- Chang, L. and Bollum, F. (1972). Low molecular weight deoxyribonucleic acid polymerase from rabbit bone marrow. Biochemistry 11: 1264-1272.
- Changeux, J.-P. y Blangy, D. (1981). Un mecanismo molecular que regula la vida: las interacciones alostericas. En: Biología Molecular. Monod, J., Jacob, F., Tatum, E., Calvin, M., Volfin, P., Bussard, A., Prigogine, I., Blangy, D., Brachet, J., Thuillier, P. y Changeux, J.-P. CONACyT, México, p. 71-87.
- Chater, K. and Hopwood, D. (1989). Diversity of bacterial genetics. En: D. Hopwood and K. Chater (eds), Genetics of Bacterial Diversity. Academic Press, London, p. 23-52.
- Chen, I. and Temin, H. (1980). Ribonucleotides in unintegrated linear spleen necrosis virus DNA. Journal of Virology 33: 1058-1073.
- Cheng, T. and Ts'o, P. (1965). Enzymatic synthesis of ribo-deoxyribopolynucleotides by the RNA polymerase. Federation Proceedings 24: 602.
- Clarke, P. (1981). Enzymes in bacterial populations. En: H. Gutfreund (ed), Biochemical Evolution. Cambridge University Press, Cambridge, p. 116-149.
- Clarke, P. (1983). Experimental evolution. En: D. Bendall (ed), Evolution from Molecules to Man. Cambridge University Press, Cambridge, p. 235-252.

Clayton, L., Goodman, M., Branscom, E. and Galas, D. (1979). Error induction and correction by mutant and wild type T4 DNA polymerases. *Journal of Biological Chemistry* 254: 1902-1912.

Cook, P. (1991). The nucleoskeleton and the topology of replication. *Cell* 66: 627-635.

Cory, C. (1988). Ribonucleotide reductase as a chemotherapeutic target. *Advances in Enzyme Regulation* 27: 437-455.

Crick, F. (1968). The origin of the genetic code. *Journal of Molecular Biology* 38: 367-379.

Daikoku, T., Yamamoto, N., Maeno, K. and Nishiyama, Y. (1991). Role of viral ribonucleotide reductase in the increase of dTTP pool size in herpes simplex virus-infected vero cells. *Journal of General Virology* 72: 1441-1444.

Demerec, M. and Hartman, P. (1959). Complex loci in microorganism. *Annual Review of Microbiology* 13: 377-406.

Domingo, E., Martínez-Salas, E., Sobrino, F., de la Torre, J., Portela, A., Ortín, J., López-Galindez, C., Pérez-Breña P., Villanueva, N., Nájera, R., VandePol, S., Steinhauer, D., DePolo, N. and Holland, J. (1985). The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations: biological relevance - a review. *Gene* 40: 1-8.

Downey, K., Byrnes, J., Jurmark, B. and So, A. (1973). Reticulocyte RNA-dependent RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 70: 3400-3404.

Edelman, P. and Gallant, J. (1977). Mistranslation in *E. coli*. *Cell* 10: 131-137.

Ellis, N. and Gallant, J. (1982). An estimate of the global error frequency in translation. *Molecular and General Genetics* 188: 169-172.

Epstein, L. and Gall, J. (1987). Self-cleaving transcripts of satellite RNA from the newt. *Cell* 48: 535-543.

Faras, A., Taylor, J., McDonnell, J., Levinson, W. and Bishop, J. (1972). Purification and characterization of the deoxyribonucleic acid polymerase associated with Rous sarcoma virus. *Biochemistry* 11: 2334-2342.

Flanegan, J. and Greenberg, R. (1977). Regulation of deoxyribonucleotide biosynthesis during in vivo Bacteriophage T4 DNA replication. *Journal of Biological Chemistry* 252: 3019-3027.

- Foster, A. and Symons, R. (1987). Self-cleavage of plus and minus RNAs of a virusoid and a structural model for the active sites. *Cell* 49: 211-220.
- Fox, C., Robinson, W., Haselkorn, R. and Weiss, S. (1964). Enzymatic synthesis of ribonucleic acid. *Journal of Biological Chemistry* 239: 186-195.
- Friedlender, B., Fry, M., Bolden, A. and Weissbach, A. (1972). A new synthetic RNA-dependent DNA polymerase from human tissue culture cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 69: 452-455.
- Fuetterer, J. and Hohn, T. (1987). Involvement of nucleocapsids in reverse transcription: a general phenomenon? *Trends in Biochemical Sciences* 12: 92-95.
- Gallo, R., Gallagher, R., Wong-Staal, F., Aoki, T., Markham, P., Schettters, H., Ruscetti, F., Valerio, M., Walling, M., O'Keefe, R., Saxinger, W., Smith, G., Gillespie, D. and Reitz, M. (1978). Isolation and tissue distribution of type-C virus and viral components from a gibbon ape (*Hylobates lar*) with lymphocytic leukemia. *Virology* 84: 359-373.
- Gardner, J. and Kado, C. (1976). High molecular weight deoxyribonucleic acid polymerase from crown gall tumor cells of periwinkle (*Vinca rosea*). *Biochemistry* 15: 688-697.
- Garvey, K., Oberste, M., Elser, J., Braun, M. and Gonda, M. (1990). Nucleotide sequence and genome organization of biologically active proviruses of the bovine immunodeficiency-like virus. *Virology* 175: 391-409.
- Gerard, G. (1975). Poly (2'-O-methylcytidylate) oligodeoxyguanylate, a template-primer specific for reverse transcriptase, is not utilized by HeLa cells as DNA polymerases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 63: 706-711.
- Gerard, G., Rottman, F., and Green, M. (1974). Poly (2'-O-methyl-cytidylate) oligodeoxyguanylate as a template for the ribonucleic acid directed deoxyribonucleic acid polymerase in ribonucleic acid tumor virus particles and a specific probe for the ribonucleic acid directed enzyme in transformed murine cell. *Biochemistry* 13: 1632-1641.
- Gilbert, W. (1986). The RNA world. *Nature* 319: 618.
- Gilden, R., Long, C., Hanson, M., Toni, R., Charman, H., Orszlan, S., Miller, J. and Van Der Maaten, M. (1975). Characteristics of the major internal protein and RNA-dependent DNA polymerase of bovine leukemia virus. *Journal of General Virology* 29: 305-314.

- Gomatos, P., Krug, R. and Tamm, I. (1964). Enzymic synthesis of RNA with reovirus RNA as template. *Journal of Molecular Biology* 9: 193-207.
- Goodman, M. and Branscomb, W. (1986). DNA replication fidelity and base mispairing mutagenesis. En: T. Kirkwood, R. Rosemberger and D. Galas (eds), *Accuracy in molecular processes*. Chapman and Hall, London, p. 191-232.
- Goodman, T., Nagel, L., Rappold, W., Klotz, G. and Riesner, D. (1984). Viroid replication: equilibrium association constant and comparative activity measurements for the viroid-polymerase interaction. *Nucleic Acids Research* 12: 6231-6246.
- Gregerson, D., Russell, P. and Reid, T. (1979). Biochemical and immunological properties of the reverse transcriptase associated with a hamster retrovirus. *Journal of General Virology* 43: 327-337.
- Guerrier-Takada, C., Gardiner, M., Marsh, T., Pace, N. and Altman, S. (1983). The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* 35: 849-857.
- Hall, Z. and Lehman, I. (1968). An *in vitro* transversion by a mutationally altered T4-induced DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology* 36: 321-333.
- Harayama, S. and Timmis, K. (1989). Catabolism of aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas*. En: D. Hopwood and K. Chater (eds), *Genetics of Bacterial Diversity* Academic Press, London, p. 151-174.
- Haselkorn, R. and Fox, F. (1965). Synthesis and properties of a complex of polyriboguanilyc acid and polyribocytidylic acid. *Journal of Molecular Biology* 13: 780-790.
- Hayes, R. and Buck, K. (1990). Complete replication of a eukaryotic virus RNA *in vitro* by a purified RNA-dependent RNA polymerase. *Cell* 63: 363-368.
- Heine, C., Kelly, D. and Avery, R. (1980). The detection of intracellular retrovirus-like entities in *Drosophila melanogaster* cells cultures. *Journal of General Virology* 49: 385-395.
- Hizi, A. and Yaniv, A. (1980). RNA-dependent DNA polymerase of an endogenous type C virus of mice: purification and partial characterization. *Journal of Virology* 34: 795-801.
- Holloway, B. and Morgan, A. (1986). Genome organization in *Pseudomonas*. *Annual Review of Microbiology* 40: 79-105.
- Holmgren, A. (1980). En: J. Jeffrey (ed), *Dehydrogenases*

Requiring Nicotinamide Coenzymes. Birkhauser-Berlag, Basel, p. 149-180.

Holmgren, A. (1981). Regulation of ribonucleotide reductase. *Current Topics in Cellular Regulation* 19: 47-76.

Holmgren, A. (1989). Thioredoxin and glutaredoxin systems. *Journal of Biological Chemistry* 264: 13963-13966.

Horowitz, N. (1945). On the evolution of biochemical syntheses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 31: 153-157.

Horowitz, N. (1965). The evolution of biochemical syntheses -retrospect and prospect. En: V. Bryson and H. Bogel (eds), *Evolving genes and proteins*. Academic Press, New York, p. 15-23.

Horrock, D. (1974). *Applications of liquid scintillation counting*. Academic Press, New York.

Hawk, R., Rye, L., Killeen, L., Scolnick, E. and Parks, W. (1973). Characterization and separation of viral DNA polymerase in mouse milk. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 70: 2117-2121.

Hruska, J. and Takemoto, K. (1975). Biochemical properties of a hamster syncytium-forming ("Foamy") virus. *Journal of National Cancer Institute* 54: 601-605.

Hübscher, U. (1984). DNA polymerase holoenzyme. *Trends in Biochemical Sciences* 9: 390-393.

Hurwitz, J. and Leis, J. (1972). RNA-dependent DNA polymerase activity of RNA tumor viruses. *Journal of Virology* 9: 116-129.

Hutchins, C., Keese, P., Visvader, J., Rathjeans, P., McInnes, J. and Symons, R. (1985). Comparison of multimeric plus and minus forms of viroids and virusoids. *Plant Molecular Biology* 4: 293-304.

Hutchins, C., Rathjeans, P., Forster, A. and Symons, R. (1986). Self-cleavage of plus and minus RNA transcripts of avocado sunblotched viroid. *Nucleic Acids Research* 14: 3627-3640.

Jacob, F. and Monod, J. (1961). On the regulation of gene activity. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology* 26: 193-209.

Jensen, E., Zellgadt, I., Chopra, H., and Mason, M. (1970).

- Isolation and propagation of a virus from a spontaneous mammary carcinoma of a rhesus monkey. *Cancer Research* 30: 2388-2393.
- Jensen, R. (1976). Enzyme recruitment in evolution of new function. *Annual Review of Microbiology* 30: 409-425.
- Jensen, R. and Byng, G. (1982). The partitioning of biochemical pathways. En: M. Rattazi, J. Scandalios and G. Whitt (eds), *Isozymes: Current Topics in Biological and Medical Research* Vol. 5, Alan R. Liss, New York, p. 143-175.
- Jensen, R. (1985). Biochemical pathways in prokaryotes can be traced backward through evolutionary time. *Molecular Biology and Evolution* 2: 92-108.
- Karkas, J. (1973). Reverse transcription by *Escherichia coli* DNA polymerase I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 70: 3834-3838.
- Karkas, J., Stavrianopoulos, J. and Chargaff, E. (1972). Action of DNA polymerase I of *Escherichia coli* with DNA-RNA hybrids as templates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 69: 398-402.
- Katinka, M. (1987). RNA-dependent DNA polymerase activity in *Paramecium tetraurelia*: what for? *European Journal of Biochemistry* 163: 569-575.
- Keese, P. and Symons, R. (1985). Domains in viroids: evidence of intermolecular RNA rearrangements and their contribution to viroid evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 82: 4582-4586.
- Kneseck, J., Nash, M., Chan, J., Bartlett, R., Bowen, J. and East, J. (1980). Intracellular RNA complementary to the RNA genome of the moloney-murine sarcoma virus complex. *Virology* 100: 288-299.
- Kohono, M. and Ishihama, A. (1979). purification and properties of RNA-dependent DNA polymerase from cytoplasmic A-type particles of murine mammary tumor virus. *European Journal of Biochemistry* 97: 257-266.
- Konarska, M. and Sharp, P. (1989). Replication by the DNA-dependent RNA polymerase of phage T7. *Cell* 57: 423-431.
- Konarska, M. and Sharp, P. (1990). Structure of RNAs replicated by the DNA-dependent T7 RNA polymerase. *Cell* 63: 609-618.
- Kornberg, A. (1980). DNA replication. Freeman and Company. San Francisco.

- Kornberg, A. (1988). DNA replication. *Journal of Biological Chemistry* 263: 1-5.
- Krakow, J. and Ochoa, S. (1963). Ribonucleic acid polymerase of *Azotobacter vinelandii*, i. Priming by polyribonucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 49: 88-94.
- Krawiec, S. and Riley, M. (1990). Organization of the bacterial chromosome. *Microbiological Reviews* 54: 502-539.
- Kruger, K., Grabowski, P., Zaug, A., Sauds, J., Gottschling, D. and Cech, T. (1982). Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclation of ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*. *Cell* 31: 147-157.
- Kuebbing, D. and Werner, R. (1975). A model for compartmentation of de novo and salvage thymidine nucleotide pools in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 72: 3333-3336.
- Kuiper, M., Sabourin, J. and Lambowitz, A. (1990). Identification of the reverse transcriptase encoded by the Mauriceville and Varkud mitochondrial plasmids of *Neurospora*. *Journal of Biological Chemistry* 265: 6936-6943.
- Kunz, B. (1982). Genetic effects of deoxyribonucleotide pool imbalances. *Environmental Mutagenesis* 4: 695-725.
- Lazcano, A. (1986). Prebiotic evolution and the origin of cells. *Treballs de la Societat Catalana de Biologia* 39: 73-103.
- Lazcano, A. (1992). The transition from non-living to living. En: S. Bengston (ed), *Early life on earth: a Nobel Symposium*. Columbia University Press, New York (en prensa).
- Lazcano, A., Guerrero, R., Margulis, L. and Oró, J. (1988a). The evolutionary transition from RNA to DNA in early cells. *Journal of Molecular Evolution* 27: 283-290.
- Lazcano, A., Fastag, J., Gariglio, P., Ramirez, C. and Oró, J. (1988b). On the early evolution of RNA polymerase. *Journal of Molecular Evolution* 27: 365-376.
- Lazcano, A., Valverde, V., Fastag, J., Gariglio, P., Ramirez, C. and Oró, J. (1990). Molecular evolution of nucleic acid polymerases. En: C. Ponnampertuma and F. Eirich (eds), *Prebiological Self Organization of Matter*. A. Deepak Publ., Hampton, p. 219-233.
- Lazcano, A., Llaca, V., Cappello, R., Valverde, V. and Oró, J. (1992a). The origin and early evolution of nucleic acid polymerases. *Advances in Space Research* 12: 207-216.

Lazcano, A., Fox, G. and Oró, J. (1992b). Life before DNA: the origin and evolution of early Archean cells. En: R. Mortlock (ed), *The Evolution of Metabolic Function*. The Telford Press, Caldwell (en prensa).

Lazcano, A., Valverde, V., Greco-Hernández, Gariglio, P., Fox, G. and Oró, J. (1992c). On the early emergence of reverse transcription: theoretical and experimental evidence. *Journal of Molecular Evolution* (en prensa).

Leis, J. and Hurwitz, J. (1972). RNA-dependent DNA polymerase activity of RNA tumor viruses. *Journal of Virology* 9: 130-142.

Lewin, B. (1990). *Genes IV*. Oxford University Press, Oxford.

Lewis, B., Abrell, J., Smith, R. and Gallo, R. (1974). DNA polymerases in human lymphoblastoid cells infected with simian sarcoma virus. *Biochimica et Biophysica Acta* 349: 148-160.

Libby, R., Nelson, J., Calvo, J. and Gallant, J. (1989). Transcriptional proofreading in *Escherichia coli*. *The EMBO Journal* 8: 3153-3158.

Libby, R. and Gallant, A. (1991). The role of RNA polymerase in transcriptional fidelity. *Molecular Microbiology* 5: 999-1004.

Linn, S. (1991). How many pols does it take to replicate nuclear DNA? *Cell* 66: 185-187.

Lindell, T., Weinberg, F., Morris, P., Roeder, R. and Rutter W. (1970). Specific inhibition of nuclear RNA polymerase II by A-amanitine. *Science* 170: 447-449.

Livingston, D. and Todaro, G. (1973). Endogenous type C virus from a cat cell clone with properties distinct from previously described feline type C virus. *Virology* 53: 142-151.

Llaca, V., Silva, E., Lazcano, A., Rangel, L. M., Gariglio, P. and Oró, J. (1990). In search of the ancestral RNA polymerase. An experimental approach. En: C. Ponnamperna and F. Eirich (eds), *Prebiological Self Organization of Matter*. A. Deepak publ., Hampton, p. 247-260.

Loeb, L., Weymouth, L., Kunkel, T., Gopinathan, K., Beckman, R. and Dube, D. (1978). On the fidelity of DNA replication. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology* 43: 921-927.

Loeb, L. and Zakour, R. (1980). Metals and genetic misco-

- ding. En: T. Spiro (ed), Nucleic acid-metal ions interactions. Jhon Wiley and Sons, New York, P. 115-144.
- Loeb, L., Dube, D., Beckman, R., Koplitz, M. and Gopinathan, K. (1981). On the fidelity of DNA replication: nucleoside monophosphate generation during polymerization. Journal of Biological Chemistry 256: 3978-3987.
- Loeb, L. and Mildvan, A. (1981). The role of metal ions in the fidelity of DNA and RNA synthesis. En: G. Eichhorn and L. Marzilli (eds), Metal Ions in Genetic Information Transfer. Elsevier, North Holland, Inc., p. 125-141.
- Loftfield, R. and Vanderjagt, D. (1972). The frequency of errors in protein biosynthesis. Biochemical Journal 128: 1353-1356.
- Losick, R. and Chamberlin, M. (1976). RNA polymerase. Cold Spring Harbor Laboratory. New York.
- Louis, G. and Fitt, P. (1971). Nucleic acid enzymology of extremely halophilic bacteria. Biochemical Journal 121: 629-633.
- Loomis, L., Rossomando, E. and Chang, L. (1976). DNA polymerase of *Dictyostelium discoideum*. Biochemica et Biophysica Acta 425: 469-477.
- Low, R., Rashbaum, S. and Cozzarelli, N. (1976). Purification and characterization of DNA polymerase III from *Bacillus subtilis*. Journal of Biological Chemistry 251: 1311-1325.
- Luthman, M., Eriksson, S., Holmgren, A. and Thelander, L. (1979). Glutathione-dependent hydrogen donor system for calf thymus ribonucleoside-diphosphate reductase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A 76: 2158-2162.
- Manwaring, J. and Fuchs, J. (1979). Relationship between deoxyribonucleoside triphosphate pools and deoxyribonucleic acid synthesis in an *nrda* mutant of *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology 138: 245-248.
- McMacken, R and Kornberg, A. (1978). A multienzyme system for priming the replication of ϕ X174 viral DNA. Journal of Biological Chemistry 253: 3313-3319.
- McMacken, R., Silver, L. and Georgopoulos (1987). DNA replication. En: F. Neidhardt (ed), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* Vol. 1, American Society for Microbiology, Washington, D. C., p. 564-612.
- Mildvan, A. and Loeb, L. (1981). The role of metal ions in

- the mechanism of DNA and RNA polymerases. En: G. Eichhorn and L. Marzilli (eds), *Metal Ions in Genetic Information*. Transfer. Elsevier, North Holland, Inc., p. 103-123.
- Mizutani, S. and Temin, H. (1976). Incorporation of noncomplementary nucleotides at high frequencies by ribodeoxyvirus DNA polymerases and *Escherichia coli* DNA polymerase I. *Biochemistry* 15: 1510-1516.
- Moening, V., Frank, H., Hunsmann, G., Ohms, P., Schwartz, H. and Schafer, W. (1974). C-type particles produced by a permanent cell line from a leukemic pig. *Virology* 57: 179-188.
- Mondal, H., Gallagher, R. and Gallo, R. (1975). RNA-directed DNA polymerase from human leukemic bloodcells and from primate type-C Virus-producing cells: high- and low-molecular-weight forms with variant biochemical and immunological properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 72: 1194-1198.
- Mortlock, R. (1976). Catabolism of unnatural carbohydrates by microorganism. *Advances in Microbial Physiology* 13: 1-53
- Mühlbach, H.-P. and Sängler, H. (1979). Viroid replication is inhibited by alpha-amanitin. *Nature* 278: 185-188.
- Mun, B. and Mathews, C. (1991). Cell cycle-dependent variations in deoxyribonucleotide metabolism among Chinese hamster cell lines bearing the Thy-mutator phenotype. *Molecular and Cellular Biology* 11: 20-26.
- Nakamoto, T. and Weiss, S. (1962). The biosynthesis of RNA: Priming by polyribonucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 48: 880-887
- Neuhoff, V., Schill, W. and Jacherts, D. (1970). *Hoppe-Seyler's Z. Physiological Chemistry* 351: 157.
- Orgel, L. (1968). Evolution of the genetic apparatus. *Journal of Molecular Biology* 38: 381-393.
- Orgel, L. (1987). Evolution of the genetic apparatus: a review. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology* 52: 9-16.
- Oró, J., Miller, S. and Lazcano, A. (1990). The origin and early evolution on life on Earth. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* 18: 317-356.
- Palukaitis, P. and Zaitlin, M. (1987). The nature and biological significance of linear potato spindle tuber viroid molecules. *Virology* 157: 199-210.

- Panem, S., Prochownik, E., Reale, F. and Kristen, W. (1975). Isolation of type C virions from a normal human fibroblast strain. *Science* 149: 297-298.
- Parsot, C. (1986). Evolution of biosynthetic pathways: a common ancestor for threonine synthase, threonine dehydratase, and D-serine dehydratase. *EMBO Journal* 5: 3013-3019.
- Parsot, C. (1987). A common origin for enzymes involved in the terminal step of the threonine and tryptophan biosynthetic pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 84: 5207-5210.
- Pato, M. (1979). Alterations of deoxyribonucleoside triphosphate pools in *Escherichia coli*: effects on deoxyribonucleic acid replication and evidence for compartmentation. *Journal of Bacteriology* 140: 518-524.
- Petsko, G. (1991). Déjà vu all over again. *Nature* 352: 104-105.
- Poiesz, B., Ruscetti, F., Gazdar, A., Bunn, P., Minna, J. and Gallo, R. (1980). Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 7415-7419.
- Prody, G., Bakos, J., Buzayan, J., Schneider, I. and Brunning, G. (1986). Autolytic processing of dimeric plant virus satellite RNA. *Science* 231: 1577-1580.
- Rackwitz, H.-R., Rohde, W. and Sanger, H. (1981). DNA-dependent RNA polymerase II of plant origin transcribes viroid RNA into full-length copies. *Nature* 291: 297-301.
- Ratner, L., Haseltine, W., Patarca, R., Livak, K., Starcich, B., Josephs, S., Doran, E., Rafalski, A., Whitehorn, E., Baumeister, K., Ivanoff, L., Petteway, S., Pearson, M., Lautenberger, J., Papas, t., Ghrayeb, J., Chang, N., Gallo, R. and Wong-Staal, F. (1985). Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. *Nature* 313: 277-284.
- Reddy, G., Shingh, A., Stafford, M. and Mathews, C. (1977). Enzyme associations in T4 phage during precursors synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 74: 3152-3156.
- Reddy, G. and Mathews, C. (1978). Functional compartmentation of DNA precursors in T4 phage-infected bacteria. *Journal of Biological Chemistry* 253: 3461-3467.
- Reddy, G. and Pardee, A. (1980). Multienzyme complex for metabolic channeling in mammalian DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 3312-3316.

- Rho, H. and Gallo, R. (1979). Characterization of reverse transcriptase from feline leukemia virus by radiolimmunoassay. *Virology* 99: 192-196.
- Rivera-Bustamante, R. and Semancik, J. (1989). Properties of a viroid-replicating complex solubilized from nuclei. *Journal of General Virology* 70: 2707-2716.
- Roeder, R. and Rutter, W. (1969). Multiple forms of DNA-dependent RNA polymerase in eukaryotic organisms *Nature* 224: 234-241.
- Rosenkranz, H. (1973). RNA in coliphage T5. *Nature* 242: 327-329.
- Rowen, L. and Kornberg, A. (1978). A ribo-deoxyribonucleotide primer synthesized by primase. *Journal of Biological Chemistry* 253: 770-774.
- Sagata, N., Yasunaga, T., Ogawa, Y., Tsuzuku-Kawamura, J. and Ikawa, Y. (1984). Bovine leukemia virus: unique structural features of its long terminal repeats and its evolutionary relationships to human T-cells leukemia virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 81: 4741-4745.
- Sarnagadharan, M., Allaudeen, H. and Gallo, R. (1976). Reverse transcriptase of RNA tumor viruses and animal cells. In: B. Marns (ed), *Methods in Cancer Research* Vol. XII, Academic Press, New York, p. 3-47.
- Scheuermann, R. and Echols, H. (1984). A separate editing exonuclease for DNA replication: the γ -subunit of *Escherichia coli* DNA polymerase III holoenzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 81: 7747-7751.
- Scholm, J. and Spiegelman, S. (1971). DNA polymerase activities and nucleic acid components of virions isolated from a spontaneous mammary carcinoma from a rhesus monkey. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 68: 1613-1617.
- Schulte, U. and Lambowitz, A. (1991). The LaBelle mitochondrial plasmid of *Neurospora intermedia* encodes a novel DNA polymerase that may be derived from a reverse transcriptase. *Molecular and Cellular Biology* 11: 1696-1706.
- Scolnick, L., Parks, W. and Todaro, G. (1972). Reverse transcriptases of primate viruses as immunological markers. *Science* 177: 1119-1121.
- Scolnick, L., Rands, E., Aaronson, S. and Todaro, G. (1970).

- RNA-dependent DNA polymerase activity in five RNA viruses: divalent cation requirements. Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A. 67: 1789-1796.
- Semancik, J. and Harper, K. (1984). Optimal conditions for cells-free synthesis of citrus exocortis viroid and the question of specificity of RNA polymerase activity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A. 81: 4429-4433.
- Shin, Y. (1973). Interaction of metal ions with polynucleotides and related compounds. XXII. Effect of divalent metal ions on the conformational changes of polyribonucleotides. Biopolymers 12: 2459-2475.
- Sirover, M., Dube, D. and Loeb, L. (1979). On fidelity of DNA replication. Journal of Biological Chemistry 254: 107-111.
- Smith, C. and Chater, K. (1987). Physiology, genetics and molecular biology of glycerol utilization in *Streptomyces coelicolor*. En: M. Alacevic, D. Ranueli and Z. Toman (eds), Genetics of Industrial Microorganism Part B, Plivia, Zagreb, p. 7-15.
- Solan, D., Loeb, L., Mildvan, A. and Feldmann, R. (1975). Determination of deoxynucleoside triphosphate substrates on DNA polymerase I from *Escherichia coli* as determined by nuclear magnetic relaxation. Journal of Biological Chemistry 250: 8913-8920.
- Sonigo, P., Alizon, M., Staskus, K., Klatzmann, D., Cole, S., Danos, O., Retzel, E., Tiollais, P., Haase, A. and Wain-Hobson, S. (1985). Nucleotide sequence of the visna lentivirus: relationships to the AIDS virus. Cell 42: 369-382.
- Spadari, S. and Weissbach, A. (1974). HeLa cells R-deoxyribonucleic acid polymerases. Journal of Biological Chemistry 249: 5809-5815.
- Speyer, J., Chao, J. and Chao, L. (1972). Ribonucleotides covalently linked to deoxyribonucleic acid in T4 bacteriophage. Journal of Virology 10: 902-908.
- Spiesmacher, E. Mülbach, H.-P., Tabler, M. and Sanger, H. (1985). Synthesis of (+) and (-) RNA molecules of potato spindle tuber viroid (PSTV) in isolated nuclei and its impairment by transcription inhibitors. Bioscience Reports 5: 251-265.
- Springgate, C. and Loeb, L. (1975). On the fidelity of transcription by *Escherichia coli* ribonucleic acid polymerase. Journal of Molecular Biology 97: 577-591.

- Stavnezer, E., Ringold, G., Varmus, H. and Bishop, M. (1976). RNA complementary to the genome of RNA tumor viruses in vi- rions and virus-producing cells. *Journal of Virology* 20: 342-347.
- Stavrianopoulos, J., Karkas, J. and Chargaff, E. (1971). Nu- cleic acid polymerases of the developing chicken embryo: a DNA polymerase preferring a hybrid template. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 68: 2207-2211.
- Steck, T., Caicuts, M. and Wilson, R. (1968). The influence of divalent cations on the activity of the ribonucleic acid polymerase of *Micrococcus lysodeikticus*. *Journal of Biological Chemistry* 243: 2769-2778.
- Steinhilber, W. and Cummings, D. (1986). A DNA polymerase activity with characteristics of a reverse transcriptase in *Podospira anserina*. *Current Genetics* 10: 389-392.
- Straat, P., Pongs, O. and Ts'o, P. (1971). RNA polymerase from *Micrococcus luteus*: comparative effect of ribosyl and deoxyribosyl oligomers on the homopolymer-directed reac- tion. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 44: 905-911.
- Sugden, B. and Keller, W. (1973). Mammalian deoxyribonucleic acid-dependent ribonucleic acid polymerases. *Journal of Biological Chemistry* 248: 3777-3788.
- Sweetser, D., Nonet, M. and Young, R. (1987). Prokaryotic and eukaryotic RNA polymerases have homologous core sub- units. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 84: 1192-1196.
- Symons, R. (1989). Self-cleavage of RNA in the replication of small pathogens of plants and animals. *Trends in Biochemical Sciences* 14: 445-450.
- Takahashi, T. and Diener, T. (1975). Potato spindle tuber viroid. XIV. Replication in nuclei isolated from infected leaves. *Virology* 64: 106-114.
- Taylor, J. (1990). Hepatitis delta virus: cis and trans func- tions required for replication. *Cell* 61: 371-373.
- Thelander, L. and Reichard, P. (1979). Reduction of ribonu- cleotides. *Annual Review of Biochemistry* 48: 133-158.
- Thierry, F., Carrancá, A. and Yaniv, M. (1987). Elements that control the transcription of genital human papillomavirus type 18. *Cancer cells* 5: 23-32.
- Tomich, P., Chiu, C-S., Wovcha, M. and Greenberg, R. (1974).

Evidence for a complex regulating the in vivo activities of early enzymes induced by bacteriophage T4. *Journal of Biological Chemistry* 249: 7613-7622.

Torrado-Litvak, L., Castroviejo, M. and Litvak, S. (1975). Studies on a DNA polymerase from wheat embryos. *FEBS Letters* 59: 125-130.

Valverde, V., Greco-Hernández, Oro, J., Gariglio, P. y Lazcano, A. (1989). Caracterización de la actividad de RNA replicasa que la reverso transcriptasa del VIH-1 presenta in vitro. Resúmenes del II Congreso Nacional sobre SIDA. México, D. F., Noviembre 13-16, 1989.

Valverde, V., Greco-Hernández, Gariglio, P., Fox, G., Oro, J. y Lazcano, A. (1990). ¿Qué tan específicas son las reverso transcriptasas? Resúmenes del XVIII Congreso Nacional de Bioquímica. San Luis Potosí, S. L. P., Noviembre 11-16, 1990, p. 173.

Volloch, V., Rits, S. and Turnerman, L. (1979). A possible mechanism responsible for the correction of transcription errors. *Nucleic Acids Research* 6: 1535-1546.

Waley, G. (1969). Some aspects of the evolution of metabolic pathways. *Comparative Biochemistry and Physiology* 30: 1-11.

Walker, R., DeClercq, E. and Eckstein, F. (1979). *Nucleoside Analogues* Plenum Press, London.

Watson, J., Hopkins, N., Roberts, J., Steitz, J. and Weiner, A. (1987). *Molecular Biology of the Gene* Vol 2, 4th. ed. Benjamin Cummings Publ. Co., Inc. Menlo Park.

Wechler, J. and Gross, J. (1971). *Escherichia coli* mutants temperature-sensitive for DNA synthesis. *Molecular and General Genetics* 113: 273-284.

Weimann, B., Schmidt, J. and Takacs, B. (1978). Purification and characterization of DNA polymerases from the plasmacytoma MOPC 104E and Abelson murine leukemia viruses. *European Journal of Biochemistry* 85: 571-579.

Weimann, B., Schmidt, J. and Wolfrum, D. (1974). RNA-dependent DNA polymerase and ribonuclease H from friend virions. *FEBS Letters* 43: 37-44.

Weinman, R. and Roeder, R. (1974). Role of DNA-dependent RNA polymerase III in the transcription of the tRNA and the 5S RNA genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 71: 1790-1794.

Weissbach, A. (1977). Eukaryotic DNA polymerases. *Annual Review of Biochemistry* 46: 25-47.

- Welch, G. and Gaertner, F. (1975). Influence of an aggregated multienzyme system on transient time: kinetic evidence for compartmentation by an aromatic-amino-acid synthesizing complex of *Neurospora crassa*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A. 72: 4218-4222.
- Wieland, T. and Faulstich, H. (1978). CRC Critical Review of Biochemistry 5: 185-260.
- Wilson, S. and Kuff, E. (1972). A novel DNA polymerase activity found in association with intracisternal A-type particles. Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A. 69: 1531-1536.
- Woese, C. (1983). The primary lines of descent and the universal ancestor. En: D. Bendall (ed), Evolution from Molecules to Man. Cambridge University Press, Cambridge, p. 208-233.
- Worcha, M., Chiu, C., Tomich, P., and Greenberg, C. (1976). Replicative bacteriophage DNA synthesis in plasmolyzed T4-injected cells: evidence for an independent pathway to DNA. Journal of Virology 20: 143-149.
- Woychic, N. and Young, R. (1990). RNA polymerase II: subunit structure and function. Trends in Biochemical Sciences 15: 347-350.
- Wu, H.-N. (1990). Hepatitis Delta virus RNA self-processing. En: F. Wu and C. Wu (eds), Structure and Function of Nucleic Acids and Proteins. Raven Press, Ltd., New York, p. 91-95.
- Yanofsky, C. (1984). Comparison of regulatory and structural regions of genes of tryptophan metabolism. Molecular Biology and Evolution 1: 143-152.
- Yças, M. (1974). On earlier states of the biochemical system. Journal of Theoretical Biology 44: 145-160.
- Yoshikawa, N. and Takahashi T. (1986). Inhibition of hop stunt viroid replication by alpha-amanitin. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz 93: 6271.
- Zillig, W., Schnabel, R. and Stetter, K. (1985). Archaeobacteria and origin of the eukaryotic cytoplasm. Current Topics in Microbiology and Immunology 114: 1-18.
- Zylber, E. and Penman, S. (1971). Products of RNA polymerase in HeLa cell nuclei. Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A. 68: 2861-2865.