

Tesis de Posgrado

RNA polimerasa I de células de tumor ascítico de Ehrlich : Su papel en el control de la síntesis de RNA ribosomal

Cereghini, Silvia Graciela

1977

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Cereghini, Silvia Graciela. (1977). RNA polimerasa I de células de tumor ascítico de Ehrlich : Su papel en el control de la síntesis de RNA ribosomal. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1547_Cereghini.pdf

Cita tipo Chicago:

Cereghini, Silvia Graciela. "RNA polimerasa I de células de tumor ascítico de Ehrlich : Su papel en el control de la síntesis de RNA ribosomal". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1977.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1547_Cereghini.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

T E S I S

"RNA POLIMERASA I DE CELULAS DE TUMOR ASCITICO DE EHRLICH:
SU PAPEL EN EL CONTROL DE LA SINTESIS DE RNA RIBOSOMAL"

Autor: SILVIA GRACIELA CEREGHINI

Director: Dra. MARIA T. FRANZE-FERNANDEZ

Lugar de Trabajo: Departamento de Química Biológica
Facultad de Farmacia y Bioquímica (U.B.A.)

N° 1547

AÑO 1977

1547 3

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Teresa FRANZE-FERNANDEZ por haberme brindado la oportunidad de encaminarme en el campo de la investigación científica y por haber contribuido con su permanente asesoramiento, apoyo y crítica, a la realización de esta investigación.

Al Dr. Alejandro C. PALADINI por haberme permitido realizar este trabajo en el Departamento de Química Biológica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica.

A la Bioquímica Silvia LAPALUCCI, mi compañera de laboratorio, por su frecuente y desinteresada colaboración.

A todos mis compañeros del Departamento de Química Biológica, por su apoyo permanente y a la Sra. A.M. de CASELLA por la preparación del manuscrito.

ABREVIATURAS

ATP	adenosina-5'-trifosfato
CM	carboxinetil
CTP	citidina-5'-trifosfato
dATP	deoxiadenosina-5'-trifosfato
dCTP	deoxicitidina-5'-trifosfato
DEAE	diethylaminoetil
dGTP	deoxiquanosina-5'-trifosfato
DNA	ácido deoxirribonucleico
DNasa	deoxirribonucleasa
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
GTP	guanosina-5'-trifosfato
mRNA	RNA mensajero
QAE	diethyl-(2-hidroxi-propil)aminoetil
RNA	ácido ribonucleico
RNA polimerasa	ribonucleósido trifosfato: RNA nucleotidil transferasa, EC 2.7.7.6
rRNA	RNA ribosomal
RNasa	ribonucleasa
SDS	dodecil sulfato de sodio
TEMED	tetrametiletildiamina
tRNA	RNA de transferencia
Tris	Tris (hidroximetil)amino metano
TTP	timidina-5'-trifosfato
UMP	uridina-5'-monofosfato
UTP	uridina-5'-trifosfato

I N D I C E

	Pág.
A N T E C E D E N T E S Y O B J E T I V O S D E L	
P R E S E N T E T R A B A J O	
1- Control "restringido" de la síntesis de RNA en bacterias	1
2- Control de la síntesis de RNA en eucariotes	2
a) Transcripción en eucariotes, diferencias con procariontes	2
b) Control "restringido" de la síntesis de RNA en eucariotes	5
c) Bases moleculares del control de la síntesis de RNA ribosomal	7
P A R T E I	
INTRODUCCION	10
MATERIALES Y METODOS	11
A- Reactivos	11
B- Métodos	11
1. Células	11
2. Soluciones	11
3. Tratamiento de las resinas de intercambio iónico	12
4. Métodos de purificación	12
a) Fraccionamiento celular	12
b) Solubilización de las RNA polimerasas	13
c) Cromatografía en DEAE-Sephadex	14
d) Cromatografía en Fosfocelulosa	14
e) Sedimentación en Gradientes de Glicerol	15
5. Determinación de la actividad de RNA polimerasa en los núcleos aislados	16
6. Determinación de la actividad de RNA polimerasa en las preparaciones de enzimas solubles	17
7. Determinación de la actividad de DNA polimerasa	18
8. Determinación de la conductividad	19
9. Determinación de DNA y proteínas	19

PURIFICACION PARCIAL Y CARACTERIZACION DE LAS RNA POLIMERASAS
DNA DEPENDIENTES DE CELULAS DE TUMOR ASCITICO DE EHRLICH

1- Determinación de la actividad de las diferentes RNA polimerasas en los núcleos aislados	20
2- Extracción de las RNA polimerasas	22
3- Resolución por cromatografía en DEAE-Sephadox	25
4- Esquema general del método de purificación parcial	29
5- Caracterización de las RNA polimerasas I y II parcialmente purificadas	30
6- Discusión	45

EFFECTO DE DIVERSOS AGENTES SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA RNA
POLIMERASA I DE CELULAS DE TUMOR ASCITICO DE EHRLICH

1- Efecto de la privación de amino ácidos, pactamicina, y toyocamicina sobre la actividad de la RNA polimerasa I en los núcleos aislados	47
2- Efecto de la privación de amino ácidos, pactamicina, y toyocamicina sobre la actividad de la RNA polimerasa I parcialmente purificada	49
3- Propiedades cromatográficas de la RNA polimerasa I : acción de los amino ácidos, pactamicina y toyocamicina	51
4- Resolución de dos formas de RNA polimerasa I por cromatografía en Fosfocelulosa	57
5- Discusión	59

RESUMEN DE LA PARTE I	62
-----------------------	----

PARTE II

INTRODUCCION	64
--------------	----

ESTUDIOS PRELIMINARES AL DESARROLLO DE UN METODO DE PURIFICACION DE LA RNA POLIMERASA I DE CELULAS DE TUMOR ASCITICO DE EHRLICH

<u>Materiales y Métodos</u>	66
A- Reactivos	66
B- Métodos	66
1. Células	66
2. Soluciones	66
3. Tratamiento de las resinas de intercambio iónico	67

	Pág.
4. Determinación de la actividad de RIA polimerasa	67
5. Determinación de proteínas	68
6. Electroforesis en Geles de Poliacrilamida	68
7. Procedimientos de purificación de la RIA polimerasa I: - descripción de dos métodos alternativos	68
<u>Resultados</u>	72
1- Estudio de las distintas etapas del procedimiento de purificación: consideraciones preliminares	72
2- Descripción de dos métodos de purificación alternativos de la RIA polimerasa I	73
<u>Conclusiones</u>	84
 PURIFICACION DE LA RIA POLIMERASA I DE CELULAS DE TUMOR ASCITICO DE EHRLICH	
<u>Materiales y Métodos</u>	87
1- Procedimiento de Purificación de la RIA polimerasa I	87
2- Electroforesis en Geles de Poliacrilamida	90
<u>Resultados y Discusión</u>	91
RESUMEN DE LA PARTE II	103
BIBLIOGRAFIA	104

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO

1.- Control de la síntesis de RNA en bacterias

La supervivencia de los organismos depende, en gran medida, de su capacidad de adaptación a cambios drásticos nutricionales. Es evidente que deben existir fuertes presiones selectivas para que las células se aprovechen de una abundancia alimenticia y para que reduzcan eficientemente, durante períodos de escasez, aquellas actividades que no son esenciales. El conocimiento de estos mecanismos regulatorios a nivel molecular ha emergido principalmente de estudios realizados en bacterias. Un ejemplo de mecanismo regulatorio que hace a la economía molecular de las células es el denominado control "restringido". Este mecanismo es el que coordina la síntesis de RNA con la actividad biosintética de proteínas. Cuando las células de Escherichia coli son privadas funcionalmente de un amino ácido, ya sea por la ausencia de un amino ácido esencial o por la restricción de la aminoacilación de algún tRNA, y son incapaces de sintetizar proteínas, se detiene abruptamente la síntesis de las especies estables de RNA (rRNA y tRNA) (Fangman y Neidhart, 1964; Neidhart, 1966). La reducción en la acumulación de rRNA es primariamente una consecuencia de la disminución en la iniciación de nuevas cadenas de rRNA (Travers, 1976). Este mecanismo de control depende de un solo locus génico ($rel A^+$). Existen mutantes de este gen ($rel A^-$) que son incapaces de inhibir la síntesis de rRNA durante la privación de amino ácidos y se dice que tienen el control "relajado" (Edlin y Broda, 1968). Una comparación de la fisiología de células normales y mutantes ha llevado a la conclusión de que los mediadores de la respuesta "restringida" son ciertos compuestos fosforilados: guanosina tetrafosfato y guanosina penta-fosfato (pp G pp y ppp G pp). El componente enzimático con capaci

dad de biosíntesis de ppGpp y pppGpp, denominado factor de "restricción", es el producto del gen $rel A^+$ y está asociado a los ribosomas (Cashel y Gallant, 1969; Haseltine y col, 1972; Cashel, 1969; Haseltine y Block, 1973). Mediante el empleo de mutantes condicionales se ha podido obtener una perspectiva bastante clara de la secuencia de sucesos que tienen lugar en células con control "restricto", cuando se las priva de aminoácidos. Hoy se sabe que cuando el alargamiento de la cadena polipeptídica queda bloqueado por la falta de un determinado aminoacil-t-RNA cargado, el codón que queda al descubierto especifica la unión enzimática del t-RNA sin cargar en el sitio aceptor del ribosoma. Este hecho anómalo estimula la actividad catalítica del factor de restricción unido al ribosoma, que se traduce en la rápida síntesis de pppGpp a partir de ATP y GTP. El pppGpp es hidrolizado posteriormente a ppGpp. Aunque se desconocen los detalles de como se activa el factor de restricción se sabe que la reacción ribosómica errónea, puede ser invertida por la unión enzimática del aminoacil-t-RNA, volviendo a empezar el alargamiento de la cadena polipeptídica (Cashel, 1975). Las evidencias actuales sugieren que el ppGpp alteraría las propiedades de la RNA polimerasa modificando su afinidad hacia los sitios promotores (Travers, 1976). De este modo el control transcripcional sería tal que la RNA polimerasa tendría un rol central en la determinación de la cantidad del transcripto. La disponibilidad de ciertos efectores, como el ppGpp, aseguraría que la cantidad de transcripción esté altamente acoplada tanto a la traducción como al estado metabólico de la célula.

2.- Control de la síntesis de RNA en células eucariotes

a) Transcripción en eucariotes, diferencias con procariones

El estudio de la síntesis de RNA y de los mecanismos que la controlan en sistemas celulares eucarióticos es mucho más difícil

de abordar que en bacterias. En principio, las células de eucariotes son más complejas estructuralmente y hay una extensa compartimentalización evidenciada cuando se estudia la distribución de funciones en la célula. Así, el núcleo y el nucleolo (además de las mitocondrias) parecen poseer sistemas transcripcionales únicos con su propia información genética y su propia maquinaria de transcripción. En lugar de una sola RNA polimerasa como en procariotes, el núcleo eucariótico posee tres enzimas estructural y funcionalmente distintas (I, II y III) (Chaabon, 1974). La RNA polimerasa I, que está localizada en el nucleolo y es responsable de la síntesis del rRNA (Blatti y col, 1970; Roeder y Roeder, 1972). La polimerasa II, que se encuentra en el nucleoplasma y sintetiza el RNA heterogéneo nuclear (Zylber y Pennan, 1971), y la polimerasa III, presumiblemente también nucleoplásmica, involucrada en la síntesis de los RNAs de bajo peso molecular (5S RNA y t-RNA) (Weinmann y Roeder, 1974; Weil y Blatti, 1976). La función de cada una de estas enzimas se ha evidenciado mediante la utilización valiosísima de la α -amanitina, un octapéptido bicíclico extraído del hongo Amanita phalloides. Esta droga a muy bajas dosis (0,1 μ g/ml) inhibe selectivamente a la RNA polimerasa II (Lindell y col, 1970; Kedingger y col, 1970), a dosis intermedias (100-200 μ g/ml) a la polimerasa III (Weinmann y Roeder, 1974; Weil y Blatti, 1975; Weil y Blatti, 1976), mientras la polimerasa I es completamente insensible a esta amatoxina (Lindell y col, 1970; Kedingger y col, 1970). Además en células eucarióticas se ha demostrado que todas las especies de RNAs, salvo el RNA mitocondrial, son transcriptos en el núcleo celular en forma de precursores de mayor peso molecular. Estos precursores sufren una serie de transformaciones postranscripcionales para producir las moléculas maduras en términos de función biológica y ser transportados finalmente al citoplasma (Burdon, 1971).

Varias técnicas utilizadas en el estudio de la transcripción en procariotes están severamente restringidas en sistemas eucarióticos.

Así, es muy difícil seleccionar y caracterizar mutantes letales con dic ion ales, debido tanto a las restringidas condiciones ambientales requeridas para el crecimiento, como a la ocurrencia usual de las células eucarióticas en el estado diploide. Los estudios genéticos están también muy limitados por la dificultad de aparear tipos celulares aislados (salvo en eucariotes muy simples como levaduras y en ciertas líneas celulares en las que puede ocurrir la fusión). Los métodos de hibridización, que han demostrado una enorme imp or tancia en el delimitamiento de la secuencia de la expresión génica tanto en bacterias no infectadas como infectadas por fagos, en eucariotes son mucho más difíciles de aplicar, debido a la extensa repetición de secuencias en sus genomas (Darnell y col, 1970; Mc Carth y, 1967). Debido a estas limitaciones el conocimiento actual de la transcripción y los mecanismos que la regulan deriva fundamental mente del empleo de agentes que afectan distintas etapas de la sín te sis de RNA.

Una ventaja que presentan las células eucarióticas es la posibilidad de aislar una fracción nuclear que refleja la capacidad sintetizante de RNA de la célula de la que proviene. Los núcleos ais lados constituyen un excelente sistema para el estudio de la transcripción ya que es posible medir la síntesis del RNA sin interferencias de la membrana plasmática. Eso evita la variabilidad en la magnitud del "pool" de nucleótidos precursores que complica la interpre tación de las velocidades de incorporación de radioactivos en células enteras (Cunningham y Pardee, 1969; Emerson, 1971) y además, permite el acceso al sitio de síntesis de moléculas (activadores o inhibidores) que no podrían penetrar en la célula. El sistema nuclear, por lo tanto, facilita el estudio de los mecanismos involucrados en la regulación de la transcripción y puede proporcionar una mayor infor mación acerca de los componentes de la maquinaria sintética de RNA, así como la presencia de factores que controlan el funcionamiento del complejo DNA-RNA polimerasa.

b) Control "restringido" de la síntesis de RNA ribosomal en eucariotes

De los diferentes sistemas de transcripción de células eucarióticas el del rRNA es quizá el más conocido (Darnell y col, 1970; Burdon, 1971). Hoy se sabe que los genes ribosomales, localizados en el nucleolo son transcritos en una sola molécula precursora, designada 45 S precursor del rRNA (45 S pre rRNA) en virtud de su característico coeficiente de sedimentación. Esta molécula precursora contiene una secuencia de 18S y otra de 28S rRNA que son las moléculas encontradas en las subunidades ribosomales menor y mayor respectivamente (Girard y col, 1965). Coincidentemente o muy poco después de la síntesis del 45 S pre rRNA se adicionan grupos metilos a las porciones de la molécula que finalmente se encuentran en los ribosomas citoplasmáticos (Zimmerman y Holler, 1967) y también ocurre una asociación a proteínas para formar las partículas de ribonucleoproteínas nucleolares (Warner y Soeiro, 1967). Este precursor así modificado es clivado en sitios específicos para dar finalmente las especies ribosomales maduras (18S y 28S rRNA) que emergen del nucleolo al citoplasma. Si bien actualmente se conocen muy bien los detalles del metabolismo del rRNA, poco se conoce de los mecanismos que regulan su síntesis. Esta regulación podría ocurrir a dos niveles. Uno es directamente a nivel de la transcripción del producto primario de los genes ribosomales o sea del 45 S pre rRNA. Otro, a nivel del complejo proceso de maduración de dicho precursor.

La velocidad de síntesis del rRNA en organismos superiores está altamente coordinada con la velocidad de proliferación de las células. Un aumento en la síntesis del rRNA y proteínas está asociado a numerosas transiciones fisiológicas inducidas por estímulos hormonales o de crecimiento (Tata, 1966). También hay evidencias de que en eucariotes operan mecanismos similares al control "restringido" de la síntesis de RNA en bacterias, pero el mecanismo por el cual se ejerce este control en células animales recién comienza a ser

estudiado. La primera sugerencia al respecto, se debe a los estudios de Shields y Korner (1970) quienes encontraron que la ausencia de todos los aminoácidos en el medio de incubación de células Landschütz produce una marcada reducción en la síntesis proteica y en la aparición, en el citoplasma, de las subunidades ribosomales. Los resultados presentados por estos autores no permitían decidir si los aminoácidos controlan la síntesis o el procesado del 45 S pre rRNA.

Aprovechando la ventaja de que por la diferente sensibilidad a la α -amanitina de las tres RNA polimerasas fue posible medir la actividad de la polimerasa I en los núcleos aislados, Franze-Fernández y Pogo (1971) demostraron, utilizando el sistema nuclear, que la concentración de aminoácidos del medio de cultivo controla la actividad de la RNA polimerasa I en células de tumor ascítico de Ehrlich. Estos autores encontraron que cuando se transfieren las células a un medio rico en aminoácidos hay un rápido aumento en la actividad de esta enzima. Este aumento se correlaciona con un incremento similar en la velocidad de síntesis del 45 S pre rRNA indicando que la actividad de la RNA polimerasa I en los núcleos aislados constituye una buena medida de la síntesis del precursor ribosomal (Franze-Fernández y Pogo, 1971). Por otra parte, se encontró que la síntesis del rRNA es muy sensible a los inhibidores de síntesis de proteínas. Así, la inyección de cicloheximida a ratas produce una disminución en la síntesis del rRNA en el hígado al cabo de una hora (Muramatsu y col, 1970). Después de 10-15 minutos de agregar cicloheximida al medio de cultivo de células HeLa (Willems y col, 1969) o células L (Craig y Perry, 1970) se observa una disminución en la síntesis del 45 S pre rRNA y la adición de cicloheximida o pactamicina al medio de incubación de las células de tumor ascítico de Ehrlich produce una rápida disminución en la actividad de la RNA polimerasa I en los núcleos aislados (Franze-Fernández y Fontanive-Sangués, 1973). Hay

que hacer notar que los aminoácidos no activan la transcripción del rRNA en presencia de inhibidores de síntesis de proteínas (Franze-Fernández y Fontanive-Sanguésa, 1973). Estos resultados, unidos al hecho de que en las células privadas de aminoácidos hay una disminución de la síntesis de proteínas, hicieron pensar que los aminoácidos controlan la transcripción del rRNA a través de su efecto sobre la síntesis proteica. Sin embargo, esta explicación no da cuenta de una serie de observaciones. Por ejemplo, el requerimiento de aminoácidos para activar la transcripción del rRNA difiere del que se necesita para estimular la síntesis proteica (Franze-Fernández y Fontanive-Sanguésa, 1973); ciertas drogas, como la toyocamicina (4-amino-5 ciano-7β-D-ribofuranosil-pirrolo [2-3 d] -pirimidina), que impiden la activación de la transcripción por los aminoácidos no inhiben la síntesis de proteínas (Iapalucci-Espinoza y col, en prensa). Recientes resultados de Grummt y col., (1976) también sugieren que la activación de la transcripción del rRNA por los aminoácidos no es a través de su efecto sobre la síntesis proteica. Por el momento éstos son los únicos resultados acerca del mecanismo de control "restringido" de la síntesis del rRNA en células animales.

c) Bases moleculares del control de la síntesis del rRNA

La velocidad de síntesis del rRNA puede estar controlada por los niveles de la RNA polimerasa I o por factores regulatorios adicionales si la enzima no es limitante. Estos factores pueden modular la transcripción alterando las propiedades del templado de cromatina y/o a través de una modificación en la enzima misma. La posibilidad de que la cantidad de enzima sea el factor responsable de la regulación fué sugerida por Onishi (1970) y Yu y Feigelson (1972) en base a medidas de la actividad de RNA polimerasa I en núcleos o nucleolos aislados de células en las que se inhibió la síntesis de

de proteínas. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la medida de la actividad de la polimerasa I en estas organelas no da una idea de la cantidad total de enzima. Experimentos de nuestro laboratorio (resultados no publicados) y de otros (Gross y Pogo, 1974; Ferencz y Seifart, 1975) indicaron que lo único que se mide en los núcleos o nucleolos aislados es la actividad de la polimerasa unida a su templado, ya que no se observa iniciación de nuevas cadenas de RNA. Es decir que si hubiera dos "pools" de enzima, uno transcribiendo y otro no, este último no se hubiera detectado. Para determinar si existen los mismos niveles de RNA polimerasa I en los núcleos aislados de células con diferente capacidad de transcripción, una posibilidad es separar la enzima de su templado por métodos convenientes y determinar la actividad enzimática con un templado de DNA exógeno. Si bien en estas condiciones la polimerasa I ya no transcribe específicamente los genes ribosomales, esto nos proporciona una medida de la capacidad transscriptiva total de la enzima. Este enfoque es precisamente el que hemos utilizado en el presente trabajo.

El examen de los niveles de RNA polimerasa I extraída de los núcleos de células de tumor ascítico de Ehrlich con diferente capacidad de transcripción se describen en la PARTE I de esta Tesis. Los resultados de este estudio indicaron que la cantidad de polimerasa I no es el componente limitante de la transcripción. Se encontró también que la disminución de la actividad de la RNA polimerasa I en los núcleos aislados está acompañada por una alteración en la conducta cromatográfica de la enzima solubilizada, sugiriendo que una modificación de la enzima podría modular su capacidad para transcribir los genes ribosomales. Para determinar si la enzima está modificada y cuál es la naturaleza de dicha modificación, se requiere analizar comparativamente la estructura molecular de la RNA polimerasa I purificada de células que revelan diferente capacidad

de transcripción del rRNA. Una primera etapa para abordar este estudio es disponer de un método que posibilite la obtención de cantidades discretas de enzima altamente purificada. Como la RNA polimerasa I de células de tumor ascítico de Ehrlich no había sido purificada se procedió a desarrollar el método de purificación de esta enzima. Su descripción está indicada en la PARTE II de esta Tesis.

P A R T E I

INTRODUCCIÓN

En el momento de iniciar este estudio aún no se habían descrito las RNA polimerasas DNA dependientes de células de tumor ascítico de Ehrlich. Fué necesario, entonces, estudiar en primer lugar el procedimiento de purificación parcial y las propiedades de estas enzimas. Como la finalidad de este trabajo era comparar los niveles de la polimerasa I presentes en células con diferente capacidad de transcripción del rRNA, se requeria disponer de un método de purificación en el que la recuperación de la actividad enzimática sea alta y reproducible. Uno de los problemas más importantes que se presentaron en el aislamiento y posterior purificación de las RNA polimerasas de células de tumor ascítico de Ehrlich, fué la gran inestabilidad de estas enzimas. Este hecho se complicó todavía más si se tiene en cuenta que las RNA polimerasas tienen una gran tendencia a interactuar con otras proteínas cromosómicas. Un método de purificación para que sea útil requiere la eficiente extracción de las enzimas y la estabilización de la actividad durante la purificación. Lograr ésto constituyó un importante problema técnico. Los primeros intentos de purificación de las RNA polimerasas de células de tumor ascítico de Ehrlich resultaron desalentadores, pues estas enzimas se inactivaban rápidamente mantenidas tanto a 0°C como a - 80°C. Esto determinó que se estudiara en primer lugar la forma de estabilizarlas. Mediante el empleo de dextranos, de altas concentraciones de glicerol, manteniendo las enzimas en forma concentrada y demás precauciones que se indicarán posteriormente, se logró desarrollar las primeras etapas de un método de purificación que cumplía con los requisitos anteriormente mencionados. Este método, se aplicó luego al aislamiento de la RNA polimerasa I de células cuya capacidad de transcripción del rRNA había sido afectada de diversa forma. Los resultados indicaron que la velocidad de síntesis del rRNA no está controlada por la cantidad de polimerasa I, sugiriendo que otros factores estarían involucrados en

la modulación de la actividad de esta enzima cuando transcribe específicamente los genes ribosomales.

MATERIALES Y METODOS

A.- Reactivos

El [^3H] UTP se obtuvo de New England Nuclear Co. El DNA de timo de ternero (Tipo 1), el ditiotreitól y los ribonucleósidos trifosfato (ATP, GTP, CTP y UTP) de Sigma Chemical Co. El sulfato de amonio, la sacarosa y el Tris (extra puros y de grado enzimático) fueron adquiridos en Schwartz Mann; el glicerol (bidestilado, extra puro) en Merck. La DEAE-Sephadex (A-25) y la Fosfocelulosa (P-11, 7.4 meq/g) fueron obtenidos de Pharmacia y Whatman respectivamente. La toyocamicina fué obsequiada por el Dr. G.Acs y la rifampicina AF/013 por el Profesor Silvestri (Lepetit, Milan). La α -amanitina y la pactamicina fueron donadas por el Profesor Th.Wieland del Max Planck Institute, Heidelberg (Alemania) y por Upjohn Co. respectivamente.

B.- Métodos

1.- Células y medios de incubación:

Las células de tumor ascítico de Ehrlich fueron inoculadas en la cavidad abdominal de ratones y extraídas 6-8 días después, lavadas dos veces con el medio de incubación a temperatura ambiente y luego incubadas a una concentración de 1×10^6 células por ml de medio. La preparación de los medios de incubación con y sin aminoácidos se realizó como se describe en trabajos previos de nuestro laboratorio (Franze-Fernández y Fontanive-Sangüesa, 1973).

2.- Soluciones

Todos los buffers fueron preparados con agua bidestilada y,

cuando se indica, el ditioneitol fué adicionado inmediatamente antes de su uso.

Buffer A: contiene 0,05 M de Tris HCl (pH 7.9 a 4°C); 5 mM de MgCl₂; 0,1 mM de EDTA; 1 mM de ditioneitol; 0,3 mg/ml de dextrans N° T70, T150 y T250, y a menos que se indique otra cosa, 30 % de glicerol.

Buffer B: tiene la misma composición que el buffer A excepto que no contiene MgCl₂.

Buffer C: contiene 0,02 M de Tris HCl (pH 7.9 a 4°C); 2 mM de ditioneitol; 5 mM de MgCl₂ y 1 M de sacarosa.

3.- Tratamiento de las resinas de intercambio iónico

La DEAE-Sephadex A-25 y la Fosfocelulosa P-11 fueron tratadas de acuerdo al método descrito por Gissinger y Chambon (1972) y equilibradas con 5 volúmenes del buffer que se indica.

4.- Métodos de Purificación

A menos que se indique otra cosa todos los procedimientos se realizaron a 0 - 4°C.

a) Fraccionamiento celular

Los núcleos fueron preparados de acuerdo al procedimiento descrito por Franze-Fernández y Pogo (1971) con las siguientes modificaciones: aproximadamente 2×10^8 células (1 g de células) fueron lavadas con 40 ml de una solución salina isotónica (pH 7.2), sedimentadas por centrifugación y resuspendidas en 10 ml de una solución hipotónica conteniendo 10 mM de Tris HCl (pH 7.9); 1 mM de MgCl₂ y 10 mM de KCl. En esta solución se dejan durante 10 minutos. Estas células fueron luego resuspendidas en 10 ml de una solución de ruptura que contiene 10 mM de Tris HCl (pH 7.9); 1,5 mM de MgCl₂; 1 mM de espermidina; 0,3 M de sacarosa; 0,3 % de Tritón

X -100 y 1 mM de ditioneitol y se rompieron mediante 3 golpes de émbolo en un homogeneizador de potter. Las células rotas fueron luego fraccionadas por centrifugación a 1500 rpm durante 2 minutos en un precipitado nuclear crudo y un sobrenadante citoplasmático que se descarta. El precipitado nuclear crudo se lavó dos veces con 10 ml de una solución conteniendo 10 mM de Tris -HCl (pH 7.9); 4 mM de $MgCl_2$; 1 mM de espermidina; 0,3 M de sacarosa y 5 mM de 2-mercaptoetanol y se resuspendió en 3,5 a 5 ml de Buffer C. La fracción nuclear así obtenida fué utilizada inmediatamente para las determinaciones de la actividad de RNA polimerasa y posterior purificación de las enzimas como se describe más adelante. Los valores de pH indicados fueron determinados a 4°C.

b) Solubilización de las RNA polimerasas

La suspensión nuclear se llevó a 0,32 M de sulfato de amonio por la adición de la cantidad apropiada de una solución stock 4 M. Cinco a siete ml de la solución viscosa resultante fueron sonicados en períodos de 10 seg., con descansos intermedios de 20 seg., con un sonicador Branson (Modelo LS 75, macro "tip", posición 3) hasta que se formaran gotas en el extremo de una pipeta Pasteur (tiempo total de sonicación: 35-40 seg.). Durante la sonicación la suspensión nuclear se mantuvo en un baño enfriado a - 8°C a - 10°C. Inmediatamente después se adicionaron dos volúmenes de Buffer A y se agitó la solución durante 15 minutos. El precipitado de cromatina formado fué removido por centrifugación durante 1 hora a 35.000 rpm en el Rotor 50 de la ultracentrífuga Spinco L. El sobrenadante, conteniendo toda la actividad enzimática, fué llevado a casi saturación con sulfato de amonio por la adición de 0,42 g de sal sólida por ml de solución. El precipitado fué colectado por centrifugación durante 70 minutos a 35000 rpm en el Rotor 40 de la ultracentrífuga Spinco L y resuspendido

en Buffer A (1-2 ml por gramo original de células). Esta fracción (Fracción F2) fué congelada durante 12 h. a -80°C .

c) Cromatografía en DEAE-Sephadex

La Fracción F2 fué diluída con Buffer A hasta que la concentración de sulfato de amonio fué de 0,05 M y alícuotas conteniendo 12-15 mg de proteínas se aplicaron a una columna de DEAE-Sephadex A-25 (0,9 x 7 cm) previamente equilibrada con Buffer A conteniendo 0,05 M sulfato de amonio. Las columnas se lavaron con el mismo buffer y, a menos que se indique otra cosa, las enzimas se eluyeron con 6 volúmenes de columna de un gradiente lineal de 0,05 a 0,4 M de sulfato de amonio en Buffer A. El flujo aplicado fué de 7 ml/hora y se colectaron fracciones de 0,75 ml en tubos conteniendo 1 mg de sero albúmina cristalina. La actividad de RNA polimerasa fué determinada inmediatamente después de su elución. Para calcular la actividad total de cada una de las RNA polimerasas eluídas de la columna de cromatografía, se reunieron separadamente las fracciones correspondientes a los respectivos picos de actividad y luego se determinó la actividad enzimática a concentraciones saturantes de sustrato como se indica en el punto 6. Aunque la suspensión nuclear y la Fracción F2 podían conservarse a -80°C por lo menos durante 30 días sin pérdida alguna de la actividad, el procedimiento de purificación se realizó siempre en días consecutivos.

d) Cromatografía en Fosfocelulosa

La Fracción F2, obtenida de células incubadas en las condiciones que se indicarán posteriormente, se dializó contra 600 veces su volúmen de buffer B conteniendo 0,1 M KCl durante 3 horas. Alícuotas de la Fracción F2 correspondientes a 0,75 g de células ($1,5 \times 10^8$ cel) se aplicaron a una columna de Fosfocelulosa P-11 (0,9 x 7 cm), previamente equilibrada con 5 volúmenes de columna de buffer B conteniendo 0,1 M KCl. La actividad enzimática se

eluyó aplicando un gradiente lineal de KCl de 0,1 M a 0,8 M en Buffer B (volumen total 30 ml). El flujo de elución fue de 4 ml/hora y se recogieron fracciones de 0,65 ml en tubos conteniendo 1 mg de sero albúmina cristalina. Inmediatamente después de su elución, la actividad de RNA polimerasa se determinó en alícuotas de 10 μ l y en la presencia de 2 μ g/ml de α -amanitina con el objeto de inhibir a la polimerasa II cuya elución es coincidente con uno de los picos de RNA polimerasa I. Dosis mayores de α -amanitina no producen una posterior inhibición de la actividad eluída de la columna indicando la ausencia de polimerasa III (Schwartz y col, 1974; Weil y Blatti, 1975; Weil y Blatti, 1976).

Cuando se realizaron estudios comparativos de las RNA polimerasas obtenidas de células incubadas en distintas condiciones, las preparaciones de enzima se realizaron en forma simultánea y bajo idénticas condiciones. Las enzimas solubilizadas fueron cromatografiadas en idénticas columnas de la resina correspondiente que fueron desarrolladas con el mismo gradiente salino empleando un dispositivo de múltiples cánulas. Se utilizó una bomba peristáltica (Desaga) para mantener un flujo de elución constante en las diferentes columnas.

e) Sedimentación en Gradientes de Glicerol

La Fracción F2, obtenida de células incubadas en las condiciones que se indicarán, fue dializada contra 300 volúmenes de Buffer A conteniendo 10 % de glicerol y 5 mM de sulfato de amonio, durante 3 horas. Alícuotas de la Fracción F2 (0,5 ml; 5-6 mg de proteínas), correspondientes a 0,5 g de células, se aplicaron sobre gradientes lineales de 15 a 30 % de glicerol en Buffer A conteniendo 50 mM de sulfato de amonio (4,5 ml) y se centrifugaron durante 20 horas a 26000 rpm y a 0°C en el Rotor SW 39 de la ultracentrífuga Spinco L. El contenido de cada tubo fue colectado por punción del fondo del tubo en fracciones de 0,25 ml y la actividad de RNA po-

limerasa se determinó inmediatamente.

5.- Determinación de la actividad de RNA polimerasa en los núcleos aislados

a) Determinación a baja fuerza iónica

La mezcla de incubación contenía en un volumen final de 0,125 ml: 3,75 μ Moles de Tris-HCl (pH 7.9); 0,5 μ Moles de $MgCl_2$; 7,5 μ Moles de NaCl; 0,25 μ Moles de ditiotreitól; 0,04 μ Moles de cada uno de los ribonucleosidos trifosfato ATP, GTP y CTP; 0,0125 μ Moles de $[^3H]$ UTP (actividad específica 40-60 Ci/Mol); 0,5 μ Moles de fosfoenolpiruvato; 0,5 μ g de piruvato kinasa y 0,1 ml de la suspensión nuclear conteniendo 100-150 μ g de DNA. Cuando se indica, se adicionó 4 μ g/ml de α -amanitina. La actividad insensible a esta concentración de α -amanitina corresponde solamente a la RNA polimerasa I, ya que no se observa una posterior inhibición de la actividad a concentraciones superiores a 200 μ g/ml de la droga (ver Figura 1) (Weinmann y Roeder, 1974; Weil y Blattli, 1976). La actividad sensible a la α -amanitina, calculada por la diferencia entre la actividad enzimática determinada en ausencia de α -amanitina y la determinada en presencia de esta droga, representa a la RNA polimerasa II. La adición de 0,4 mg/ml de heparina a la mezcla de incubación no afecta la actividad de RNA polimerasa. Dado que se ha demostrado que la heparina inhibe la iniciación de nuevas cadenas de RNA (Udvardy y Seifart, 1976), ésto indica que la actividad medida en los núcleos aislados corresponde a la enzima unida a su templado.

Luego de la incubación durante 8 min a 37°C, salvo que se indique otra cosa, la reacción se detuvo por la adición de 15 μ g de RNA, seguido por 7 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 5 % conteniendo 20 mM de pirofosfato de sodio. El precipitado fué colectado por centrifugación y lavado 3 veces con 7 ml de TCA 5 % - 20 mM pirofosfato

de sodio. El precipitado final se disolvió en 0,3ml de NCS (Nuclear Chicago Solubilizer) y la radioactividad se contó en 6 ml de líquido centellador de tolueno que contenía 0minifluor a una concentración de 4g/litro. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado. La concentración de UTP en esta mezcla de reacción no era limitante. La eficiencia del contaje (aproximadamente 20 %) fué determinada por el método de standard externo.

b) Determinación a alta fuerza iónica

Cuando se indica, la actividad de RNA polimerasa en los núcleos aislados se determinó a alta fuerza iónica. La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 50 μ l los mismos componentes indicados para el dosaje de las polimerasas solubles, salvo que se omitió el DNA y la concentración de sulfato de amonio era de 0,32 M. La reacción fué iniciada por la adición de 20 μ l de la suspensión nuclear conteniendo 30-40 μ g de DNA y luego de la incubación a 37°C dte. 8 min, salvo que se indique otra cosa, la reacción se detuvo y la radioactividad se contó como en a). La actividad de las RNA polimerasas I y II se determinó como se indica en a).

6.- Determinación de la actividad de las RNA polimerasas en las preparaciones de enzimas solubles

Las determinaciones se realizaron en un volumen final de 50 μ l. Inicialmente cada tubo de reacción tenía en un volumen final de 30 μ l, los siguientes componentes: Tris-HCl (pH 7.9) 2,4 μ moles; Mn Cl₂ 0,08 μ moles; NaF 0,3 μ moles; fosfoenolpiruvato 0,25 μ moles; piruvato kinasa 0,25 μ g; ditiotreititol 0,05 μ moles; 2-mercaptoetanol 0,08 μ moles; ATP, GTP y CTP 0,028 μ moles de cada uno; 0,5 nmoles de UTP no marcado; 0,5 μ Ci de [³H] UTP (actividad específica 1000 Ci/Mol) y 5 μ g de DNA de timo de ternero. El estado del templado de DNA (nativo o denaturalizado) y la concentración final de sulfato

de amonio en la mezcla de reacción se indicarán en cada experimento. En los extractos crudos (Fracción F2) la actividad enzimática fué determinada en presencia y ausencia de 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de α -amanitina y la actividad correspondiente a las RNA polimerasas I y II se determinó como se describe en el punto 5.- Las reacciones fueron iniciadas por la adición de alícuotas de 5 a 20 μl de las soluciones de enzima. El volumen restante fué completado con Buffer A conteniendo la cantidad apropiada de Mg Cl_2 de modo que su concentración final en la mezcla de reacción fuera de 2,5 mM. Después de un período de incubación de 10 minutos a 37°C, salvo que se indique otra cosa, las reacciones se detuvieron en frío por la adición de 30 μl de SDS 1 % - pirofosfato de sodio 0,05 M. Se tomaron alícuotas de 70 μl y se pipetearon sobre filtros Whatman DE-81 (2,5 cm de diámetro). Los filtros se procesaron y la radioactividad se midió como lo indica Lindell y col (1970). El [^3H] se leyó con una eficiencia del 30 %. La mezcla de reacción descrita anteriormente contenía niveles no saturantes de UTP (0,01 mM) y se utilizó en las determinaciones de rutina. Sin embargo, cuando se compararon las actividades enzimáticas en las diferentes etapas de purificación, la concentración de UTP se elevó a un nivel saturante de 0,10 mM. Esta concentración se estimó de la curva de actividad de las RNA polimerasas en función de cantidades crecientes de UTP. Ligeras diferencias en la actividad de las RNA polimerasas se observaron entre las distintas preparaciones de DNA, probablemente debido a variaciones en el número de rupturas en una cadena o de regiones denaturalizadas. Por lo tanto, en los estudios comparativos de los niveles de actividad y propiedades de las enzimas aisladas de células incubadas en distintas condiciones se utilizaron alícuotas de la misma preparación de DNA.

7.- Determinación de la actividad de DNA polimerasa

La actividad de DNA polimerasa fué determinada utilizando la mezcla de reacción denominada Sistema C, por Franze-Fernández y col.(1975)

con la adición de 0,2 mM de dATP, dGTP y dCTP; 0,02 mM $[\text{CH}_3\text{-H}^3]$ -TTP (actividad específica 350 $\text{cpm}/\mu\text{mol}$) y 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de DNA de timo de ternero "activado."

8.- Determinación de la conductividad

La concentración de sulfato de amonio en las preparaciones de enzimas y fracciones eluidas de las columnas de cromatografía se determinó tomando una alícuota de 10 μl , mezclándola con 3 ml de agua bidestilada y midiendo la conductividad a temperatura ambiente con un Indicador de Resistencia Electrolítica N°4960, (Leeds and Northrup Co.). Las concentraciones salinas se calcularon por interpolación de curvas standards previamente construídas con soluciones de sulfato de amonio conocidas en Buffer A.

9.- Determinación de DNA y proteínas

Las determinaciones de DNA se realizaron por el Método de Burton (1956). Las concentraciones de proteínas de las preparaciones de enzima se determinaron por absorbancia a 230 nm en alícuotas de 0,1 ml en 0,9 ml de agua bidestilada o por el Método de Lowry y col (1951). En ambos métodos se utilizó sero albúmina cristalina como standard.

PURIFICACION PARCIAL Y CARACTERIZACION DE LAS RNA POLIMERASAS DNA DEPENDIENTES DE CELULAS DE TUMOR ASCITICO DE EHRLICH

1.- Determinación de la actividad de las diferentes RNA polimerasas en los núcleos aislados

Como se indicó previamente (Introducción General) las tres clases principales de RNA polimerasas DNA dependientes de eucariotes se pueden distinguir por su diferente sensibilidad a la α -amanitina. En todas las células animales estudiadas la RNA polimerasa I es completamente resistente a esta toxina aún a concentraciones tan elevadas como 200-400 $\mu\text{g/ml}$, mientras la polimerasa II es inhibida totalmente por muy bajas concentraciones (0,1 a 0,5 $\mu\text{g/ml}$) de α -amanitina (Lindell y col, 1970; Kedinger y col, 1970; Jacob, 1973). La RNA polimerasa III es sensible a concentraciones intermedias de esta toxina, ya que la inhibición total se logra en una concentración de 150 a 200 $\mu\text{g/ml}$ (Weinmann y Roeder, 1974; Weil y Blatti, 1975; Hossenlopp y col, 1975). Mediante el uso de la α -amanitina es posible determinar la actividad de cada una de estas enzimas en sistemas complejos como los núcleos aislados. Así, la actividad no inhibible por altas concentraciones de α -amanitina corresponderá a la polimerasa I, la inhibible por bajas concentraciones (hasta aprox. 0,1 $\mu\text{g/ml}$) a la polimerasa II y la actividad que es sensible desde 0,1 $\mu\text{g/ml}$ hasta 200 $\mu\text{g/ml}$ a la polimerasa III. Como se muestra en la Figura 1, la máxima inhibición de la actividad de RNA polimerasa en los núcleos aislados de células de tumor ascítico de Ehrlich se logra a una concentración de 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de α -amanitina. Los resultados no indican la presencia, dentro de los límites de detección del ensayo (3 a 5 % de la actividad total), de RNA polimerasa III ya que no se observa una posterior inhibición de la actividad enzimática a concentraciones de 200 $\mu\text{g/ml}$ de la droga. Por lo tanto en nuestra preparación de núcleos aislados, la actividad insensible a la α -amanitina corresponde principalmente a la RNA polimerasa I, mientras que la actividad sensible, calculada por la diferencia

entre la actividad enzimática determinada en ausencia de α -amanitina y la determinada en presencia de concentraciones de la droga iguales o superiores a $0,1 \mu\text{g/ml}$, representa a la RNA polimerasa II.

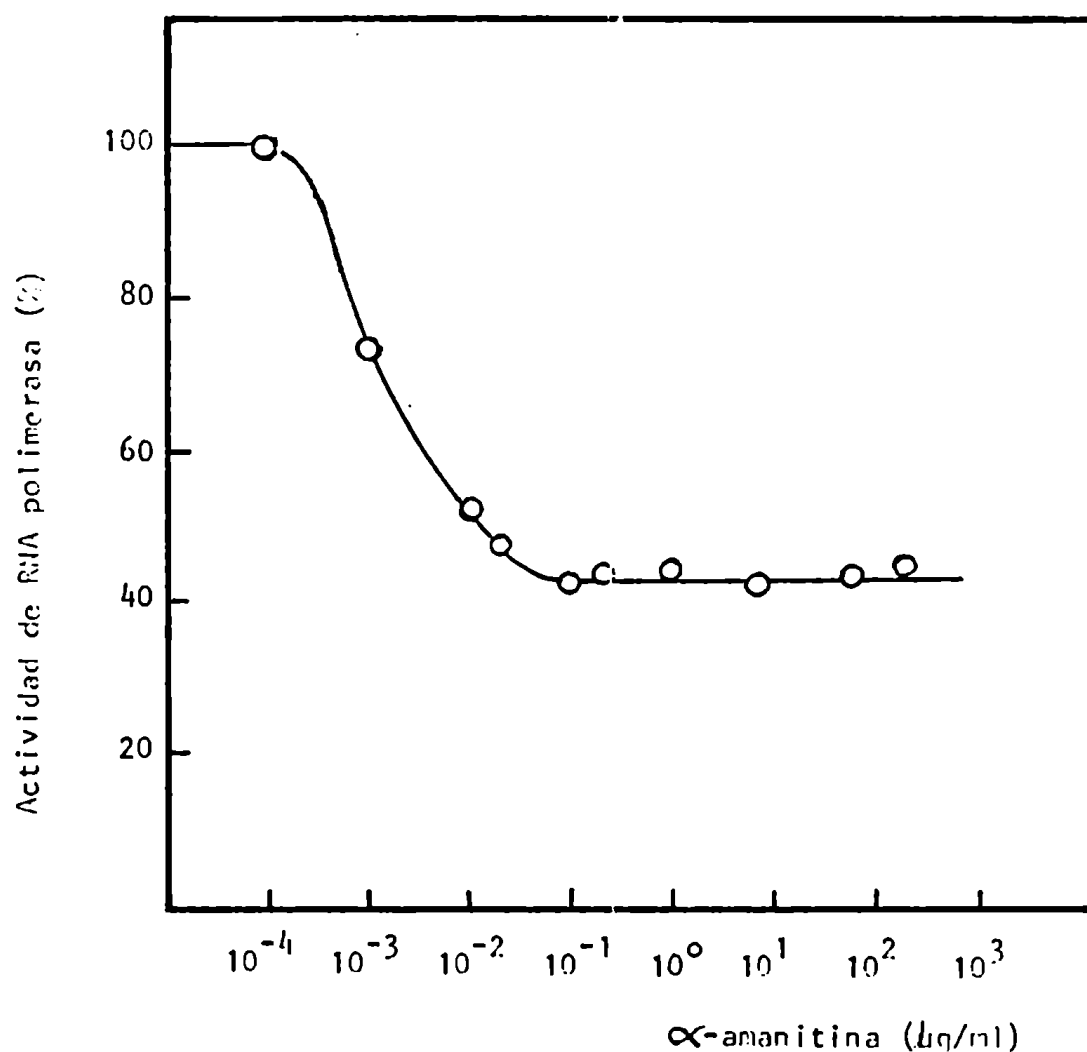


Figura 1: Efecto de concentraciones crecientes de α -amanitina sobre la actividad de las RNA polimerasas en los núcleos aislados. Las células se incubaron en un medio completo durante 90 minutos. Al cabo de ese tiempo se aislaron los núcleos y se determinó la actividad de RNA polimerasa a baja fuerza iónica (ver Métodos) y en presencia de las concentraciones indicadas de α -amanitina. La actividad de RNA polimerasa (○—○—○) se expresa como porcentaje de la actividad medida en ausencia de α -amanitina. 100 % representa la incorporación de 907 picogramos de UMP por ml. en 8 minutos.

2.- Extracción de las RNA polimerasas

Para determinar la actividad de las diversas RNA polimerasas solubilizadas de los núcleos de células incubadas en distintas condiciones es importante utilizar un método de extracción de las enzimas que no resulte en pérdidas significativas de la actividad o de posibles factores regulatorios. En los distintos sistemas de eucariotes estudiados se han utilizado procedimientos diversos de extracción de las RNA polimerasas con éxito variable dependiendo de la enzima (polimerasa I, II ó III) y del sistema (Jacob, 1973). Por lo tanto, se realizó un estudio preliminar comparando los resultados de la aplicación de distintos métodos de solubilización, a saber: agitación a baja concentración salina, extracciones sucesivas con concentraciones crecientes de sulfato de amonio (desde 0,2 M a 1 M de la sal), previa agitación por tiempos variables, sonicación a baja y alta fuerza iónica. Los rendimientos máximos de actividad soluble, en particular de la RNA polimerasa I, se obtuvieron sólo cuando se incluyó la etapa de sonicación a alta concentración salina. En efecto, mientras la actividad de la RNA polimerasa II podía solubilizarse eficientemente por otros procedimientos (por ejemplo por agitación a 0,5 M de sulfato de amonio), un elevado porcentaje (aproximadamente un 30 %) de la actividad de la RNA polimerasa I permanecía fuertemente asociada a la cromatina, siendo insoluble en esas condiciones. Por consiguiente, la actividad de las RNA polimerasas presentes en los núcleos aislados de células de tumor ascítico de Ehrlich se solubilizaron por procedimientos que incluyen sonicación a alta fuerza iónica, reducción de la fuerza iónica por dilución con posterior eliminación de la cromatina por centrifugación y fraccionamiento con sulfato de amonio (ver "Métodos"). De esta forma se obtuvo la Fracción F2. Mediante la precipitación con sulfato de amonio se consiguió purificar parcialmente y concentrar las enzimas solubilizadas, con la consiguiente estabilización de las mismas. En las fracciones descartadas no se detectó actividad enzimática alguna. La ruptura sónica de los núcleos en una solución a alta fuerza iónica libera la totalidad

de la actividad de RNA polimerasa en una forma soluble totalmente dependiente de la adición de un DNA exógeno (datos no mostrados). Además, la Fracción F2 no contiene DNA detectable. Esto último es importante para la posterior purificación de las enzimas por cromatografía en resinas de intercambio iónico. Con la finalidad de determinar la reproducibilidad del procedimiento de solubilización se hicieron dos preparaciones simultáneas (F2a y F2b) partiendo de la misma suspensión de núcleos (Tabla I). Como lo indican los datos de la Tabla I por este método se obtiene una alta y reproducible recuperación de la actividad enzimática.

TABLA I : Solubilización de las RNA polimerasas

Etapa de Purificación	Actividad de RNA polimerasa (picomoles/g de células)			
	I	Recuperación %	II	Recuperación %
Núcleos	4670	100	7707	100
F2a	3652	78	5425	70
F2b	3489	75	5642	73

Las células fueron incubadas durante 60 minutos en un medio completo. Al cabo de ese tiempo se aislaron los núcleos y se determinó la actividad de RNA polimerasa a alta fuerza iónica según se indica en "Métodos". La suspensión nuclear se dividió en dos alícuotas iguales y las RNA polimerasas se solubilizaron de cada alícuota en forma simultánea y bajo idénticas condiciones por el procedimiento descrito en "Métodos". La actividad de RNA polimerasa soluble (F2a y F2b) se determinó en presencia de 0,10 mM UTP; 0,06-0,07 M de sulfato de amonio y DNA denaturalizado. En los núcleos aislados y F2 la actividad de RNA polimerasa se determinó en ausencia y presencia de 4 μ g/ml de α -amanitina. La actividad de las RNA polimerasas I y II se determinó como se indica en "Métodos". La actividad enzimática está expresada en picomoles totales de UMP incorporados en RNA en 10 min por gramo original de células.

En la figura 2 se ilustra el efecto de concentraciones crecientes de α -amanitina sobre la actividad de las RNA polimerasas presentes en la Fracción F2. La concentración de α -amanitina requerida para alcanzar la máxima inhibición de la actividad sensible (0,1 $\mu\text{g/ml}$) es comparable a la obtenida con la actividad endógena de RNA polimerasa en los núcleos aislados (Figura 1). En la Fracción F2, como en los núcleos aislados, no se pudo detectar actividad correspondiente a la RNA polimerasa III ya que no se observó una posterior inhibición de la actividad enzimática en todo el rango de concentraciones de α -amanitina desde 0,1 a 200 $\mu\text{g/ml}$ (Weinmann y Roeder, 1974; Mail y Blatti, 1976) (Figura 2).

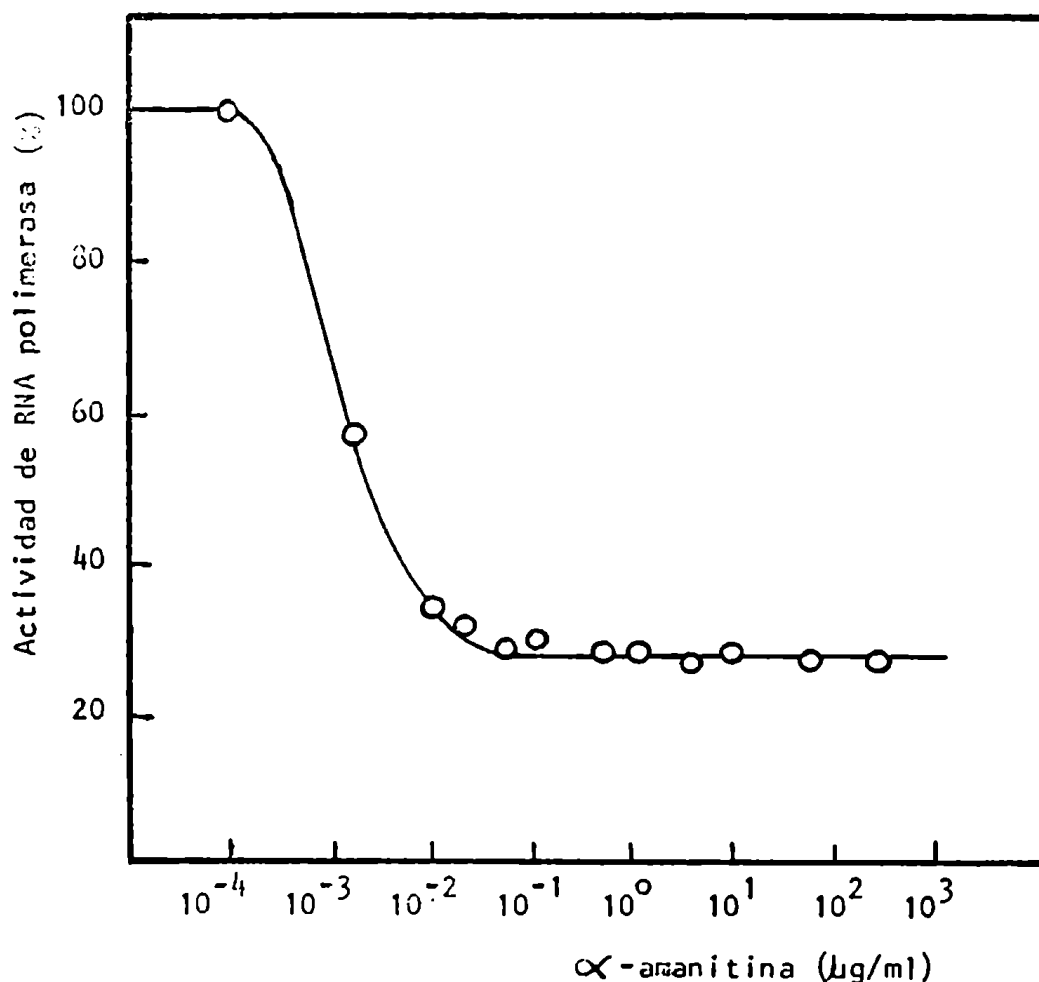


Figura 2: Efecto de concentraciones crecientes de α -amanitina sobre la actividad de las RNA polimerasas en la Fracción F2. La solubilización de las RNA polimerasas y obtención de la Fracción F2 se realizó como se indica en la Tabla I. La actividad de RNA polimerasa se determinó en presencia de 0,01mM UTP; 0,06-0,07 M de sulfato de amonio; DNA denaturalizado y las concentraciones indicadas de α -amanitina. La actividad máxima (100%) representa la incorporación de 989 piconoles/ml de UMP en 10 min.

3.- Resolución por cromatografía en DEAE-Sephadex

La cromatografía en DEAE-Sephadex resuelve a las RNA polimerasas solubilizadas en dos picos de actividad que se designaron I y II (Figura 3).

El primer pico eluye a 0,07 - 0,09 M de sulfato de amonio y es insensible aún a altas concentraciones (200 $\mu\text{g/ml}$) de α -amanitina (Figura 6).

El segundo pico eluye a aproximadamente 0,25 M de sulfato de amonio y es totalmente inhibido por muy bajas concentraciones (0,10 $\mu\text{g/ml}$) de la droga (Figuras 3 y 8). Con respecto a estas propiedades las formas I y II se corresponden con las RNA polimerasas I y II (A y B siguiendo la terminología de Chambon y col, 1970) de otros organismos eucarióticos (Chambon y col, 1970; Roeder y Rutter, 1969; Blatti y col, 1970; Schwartz y col, 1974).

Las polimerasas I y II exhiben diferentes propiedades catalíticas (ver más adelante) y sus características de elución en DEAE-Sephadex se mantienen después de la recromatografía en idénticas condiciones (Figura 4). Es decir que no se observan complejos disociables o interconvertibilidad en ninguna de las dos enzimas.

Como era de esperar, de acuerdo a los resultados indicados en los núcleos aislados (Figura 1) y en la Fracción F2 (Figura 2), no se encontró el pico de actividad correspondiente a la RNA polimerasa III^{que}, por lo menos, en plasmacitoma murínico (Schwartz y col, 1974), timo de ternero (Weil y Blatti, 1975) y células HeLa (Weil y Blatti, 1976) eluye en la vecindad de la RNA polimerasa II.

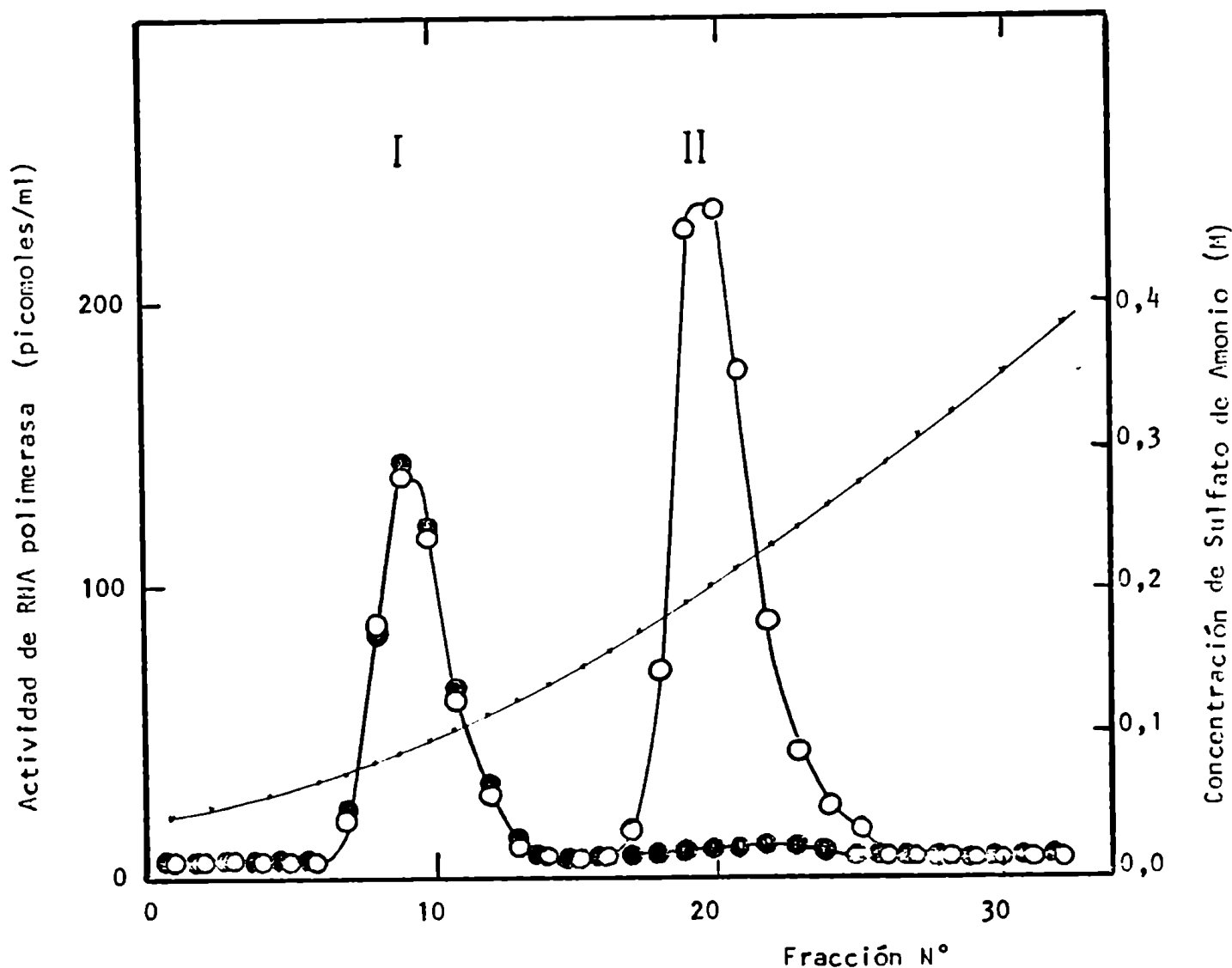


Figura 3: Resolución de las RNA polimerasas por cromatografía en DEAE-Sephadex. Las RNA polimerasas se solubilizaron de los núcleos de células incubadas 90 min en un medio completo. Una alícuota de la Fracción F2 correspondiente a 0,85 g de células y conteniendo 12 mg de proteína se cromatografió en una columna de DEAE-Sephadex (0,9x7 cm) como se describe en "Métodos". La actividad de RNA polimerasa se determinó en presencia de 0,01 ml de UTP, DNA denaturalizado y a la concentración de sulfato de amonio resultante de la dilución de 20 μ l de cada una de las fracciones en el volumen final de 50 μ l de la mezcla de reacción que se indica en "Métodos". Esta concentración salina era ligeramente subóptima para las fracciones del pico I y cercana a la óptima para las fracciones del pico II. La actividad de RNA polimerasa está expresada en picomoles de UMP incorporados en RNA por ml en 8 min. Los valores de actividad de cada pico eran 2,7-3,3 veces mayores cuando se determinan a 0,10 mM de UTP. Actividad de RNA polimerasa en la ausencia (○-○-○) y en la presencia (●-●-●) de 1 μ g/ml de α -amanitina. (—) Concentración de sulfato de amonio.

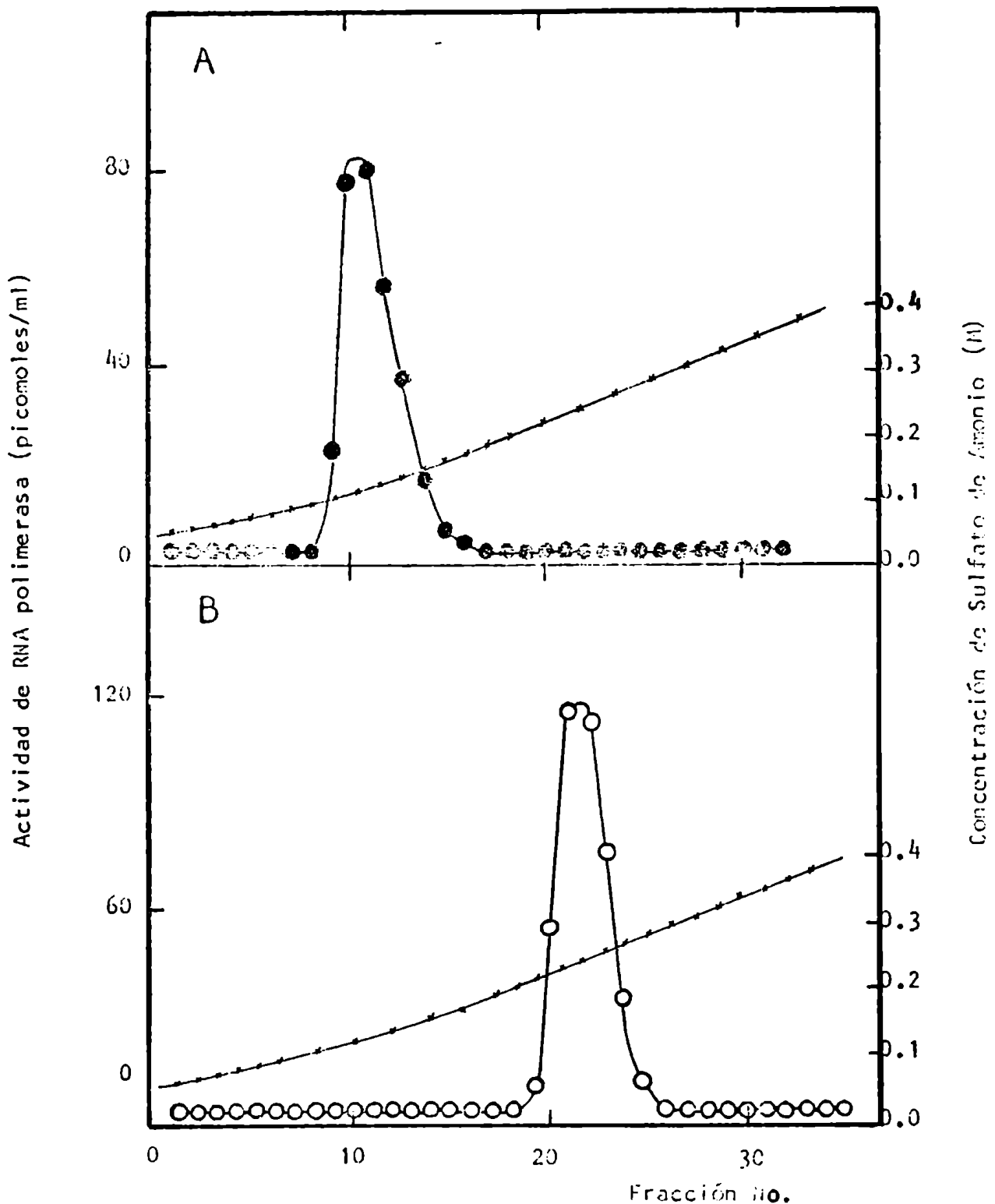


Figura 4: Recromatografía en DEAE-Sephadex de las RNA polimerasas I y II. Una alícuota de la Fracción F2 correspondiente a 0,8 g de células se cromatografió en DEAE-Sephadex como se describe en la Figura 3. Las Fracciones correspondientes a los picos de actividad de las RNA polimerasas I y II respectivamente se reunieron separadamente, se diluyeron con Buffer A, hasta una concentración de sulfato de amonio de 0,05 M y se recromatografiaron en idénticas columnas de DEAE-Sephadex (0,9x7 cm) como se indica en la Figura 3. En **A** se muestra el perfil de elución de la RNA polimerasa I (●—●—●) y en **B** el de la RNA polimerasa II (○—○—○). La actividad de RNA polimerasa se determinó como se describe en la Figura 3. (—+—+—) Concentración de Sulfato de Amonio.

Las recuperaciones de la actividad de las RNA polimerasas I y II en la cromatografía en DEAE-Sephadex (con respecto a la Fracción F2), en diversos experimentos independientes, se indican en la Tabla II.

TABLA II :		Recuperación de la actividad de las RNA polimerasas en la cromatografía en DEAE-Sephadex	
Experimento N°	% de actividad de las RNA polimerasas recuperada en la cromatografía en DEAE-Sephadex		
	I	II	
1	97	82	
2	107	79	
3	111	85	
4	92	70	
5	102	72	

Las RNA polimerasas se purificaron por cromatografía en DEAE-Sephadex como se describe en "Métodos". Los porcentajes de recuperación de la actividad de las polimerasas I y II se calcularon en base a las actividades enzimáticas de la Fracción F2 insensibles y sensibles a 4 $\mu\text{g/ml}$ de α -amanitina.

Se observa una alta y reproducible recuperación de la actividad de la RNA polimerasa I. El incremento aparente de la actividad de esta enzima en la etapa de DEAE-Sephadex se debe probablemente a la presencia de componentes inhibitorios en los extractos crudos (Fracción F2) (Kedinger y col, 1972; Schwartz y Roeder, 1974; Roeder, 1974). La recuperación de actividad de la polimerasa II no es tan alta; como para esta enzima se han descrito factores de activación (Stein y Hausen, 1970; Sudgen y Keller, 1973), es probable que la menor recuperación se deba a la pérdida de algún factor. En la Fracción F2 no se detecta pérdida alguna de la actividad enzimática luego de 25-30 días de congelamiento a -80°C .

Sin embargo, después de la purificación por DEAE-Sephadex las enzimas son más inestables, manteniendo el 100 % de la actividad sólo durante los 2-3 primeros días de congelamiento a -80°C . En períodos mayores de tiempo se observa una mayor inestabilidad de la polimerasa I con respecto a la II. En efecto, los porcentajes de supervivencia de la actividad enzimática por congelamiento a -80°C a los 5, 9 y 20 días son de 75 %, 55 %, y 15 % para la RNA polimerasa I y de 100 %, 100 % y 85 % para la RNA polimerasa II. Una mayor estabilidad de la polimerasa II con respecto a la polimerasa I ha sido indicada también en otros sistemas de eucariotes estudiados (Roeder y Rutter, 1970; Jacob, 1973).

4.- Esquema general del Método de Purificación parcial

En la Tabla III se resume el proceso de purificación de las RNA polimerasas de células de tumor ascítico de Ehrlich. Los cálculos de las recuperaciones de la actividad enzimática presente en la suspensión de núcleos originales (considerada como 100 %) deben tomarse con cierta cautela pues este valor original representa la actividad de las RNA polimerasas frente a su propio templado cromosómico, mientras que la actividad de las enzimas solubles se determina frente a un templado de DNA exógeno. No obstante, las recuperaciones en las sucesivas etapas del procedimiento de purificación son siempre elevadas y altamente reproducibles.

Los rendimientos de las enzimas obtenidos por este método de purificación son comparables a los indicados en otras células eucarióticas (Kedinger y col, 1972; Sudgen y Keller, 1973; Schwartz y col, 1974).

TABLA III : Resumen de Purificación de las RNA polimerasas DNA dependientes de células de tumor ascítico de Ehrlich

Etapa de Purificación	Actividad de RNA polimerasa Picomoles/g de células			
	I	Recuperación %	II	Recuperación %
Núcleos	4531	100	6287	100
Fracción F2	3597	79	5270	84
DEAE-Sephadex	3677	81	3823	61

Los datos de la tabla resumen los resultados de un experimento representativo. Las células se incubaron 90 min en un medio con aminoácidos. Al cabo de este tiempo se aislaron los núcleos y se purificaron las RNA polimerasas como se describe en "Métodos". La actividad de las polimerasas I y II en los núcleos aislados y en la Fracción F2 se determinó como se describe en la Tabla I. En la etapa de DEAE-Sephadex la actividad enzimática se determinó en presencia de 0,10 mM de UTP y DNA denaturalizado. La concentración de sulfato de amonio en la mezcla de reacción era de 35 mM y 80 mM para las polimerasas I y II respectivamente. La actividad enzimática está expresada en picomoles totales de UMP incorporados en RNA en 10 min por gramo original de células.

5.- Caracterización de las RNA polimerasas I y II parcialmente purificadas

La caracterización de las RNA polimerasas con respecto a las diferentes propiedades que se describirán a continuación se realizó con las enzimas purificadas por cromatografía en DEAE-Sephadex. Con la finalidad de que los resultados sean comparables, este estudio se hizo en condiciones similares a las indicadas para las enzimas análogas aisladas de otros sistemas de eucariotes.

a) Propiedades de la reacción catalizada por las RNA polimerasas

Las características generales de la reacción catalizada por las RNA polimerasas I y II se muestran en la Tabla IV.

Ambas enzimas muestran un absoluto requerimiento de DNA, de un cation divalente (Mg^{++} ó Mn^{++}) y de los cuatro ribonucleósidos trifosfato.

El tratamiento con actinomicina o DNasa impide la síntesis de RNA. El producto formado es RNA, como lo demuestra su destrucción en la presencia de álcali o RNasa. Por lo tanto, las dos actividades enzimáticas exhiben todas las características esperadas de las RNA polimerasas DNA dependientes. Las preparaciones de las enzimas no muestran actividad de nucleasas. Aunque es probable que haya nucleasas presentes, dado que estas preparaciones de enzima están aún impuras, éstas no tienen un efecto cuantitativo sobre las determinaciones de la actividad pues los RNAs sintetizados no son degradados durante todo el período de incubación.

La rifampicina AF/013, un derivado semi-sintético de la rifampicina, se ha demostrado que inhibe la iniciación, pero no la elongación, de cadenas de RNA por las RNA polimerasas I y II de timo de ternero (Meilhac y col, 1973) y de hígado de rata (Butterworth y col, 1971).

Como en esos sistemas, la preincubación de las enzimas con rifampicina AF/013 inhibe toda la actividad.

TABLA IV : Caracterización de la reacción catalizada por las RNA polimerasas I y II

Condición experimental	Actividad de RNA polimerasa	
	I	II
Medio de incubación normal	100	100
- DNA	0	0
- ATP, GTP, CTP	2,2	4
- Mn^{++} y Mg^{++}	0	0
+ Actinomicina D (40 μ g/ml)	2,3	1,8
+ DNasa	0	0
+ RNasa	23	25
+ NaOH	2,7	3,2
"Desplazamiento" con UTP no marcado	97	98
+ Rifampicina AF/013	0	0

- Las RNA polimerasas I y II fueron purificadas por cromatografía en DEAE-Sephadex como se indica en la Tabla III y, salvo las omisiones ó adiciones indicadas, su actividad se determinó en presencia de 0,01 mM UTP, a la concentración salina óptima de cada enzima (ver Figura 10 y Tabla VI) y utilizando DNA nativo como templado para la polimerasa I y DNA denaturalizado para la polimerasa II. La DNasa I (80 μ g/ml) fué preincubada 10 min a 37°C con la mezcla de incubación antes de la adición de las enzimas. La RNasa pancreática (20 μ g en 0,020 ml de H₂O) ó 0,02 ml de NaOH2N se adicionaron después de 10 minutos de incubación y la incubación se continuó por un período adicional de 20 minutos. En el experimento de "desplazamiento" se adicionó un exceso de 50 veces de UTP no marcado (cuando las otras reacciones habían finalizado) y la incubación se continuó por un período de 20 minutos. Los controles contenían H₂O. Cuando se indica, las enzimas fueron preincubadas con rifampicina AF/013 (200 μ g/ml) durante 5 min a 0°C antes de la adición de los restantes componentes de la reacción. 100 % representa la actividad de las RNA polimerasas I y II en condiciones normales de incubación y corresponde a 298 y 487 picomoles/ml de UMP incorporados en 10 min. respectivamente.

b) Requerimientos de UTP de la RNA polimerasa I

Debido al elevado costo de los nucleósidos trifosfato radioactivos, la mezcla de la determinación de la actividad de las RNA polimerasas utilizada en los ensayos de rutina contenía cantidades limitantes de UTP (0,01 mM) (ver "Métodos"). Sin embargo para cuantitar los niveles de actividad de las RNA polimerasas extraídas de células incubadas en diferentes condiciones ó para determinar las recuperaciones de la actividad enzimática en las sucesivas etapas de purificación se requería el empleo de concentraciones saturantes de este nucleótido. Por esta razón se determinó la actividad de la RNA polimerasa I en función de concentraciones crecientes de UTP. Como se ilustra en la Figura 5, esta enzima exhibía la típica cinética de Michaelis Menton al aumentar la concentración de UTP. Del gráfico de las inversas se calculó un valor de Km aparente de 25 μ M para UTP. En base a estos resultados las determinaciones de la actividad enzimática en condiciones no limitantes de sustrato se realizaron a una concentración de UTP de 0,1 mM.

Por otra parte, como se detalla en "Métodos", en todos los ensajos se utilizaron siempre concentraciones saturantes de los otros tres ribonucleósidos trifosfato (aprox. 0,30 mM).

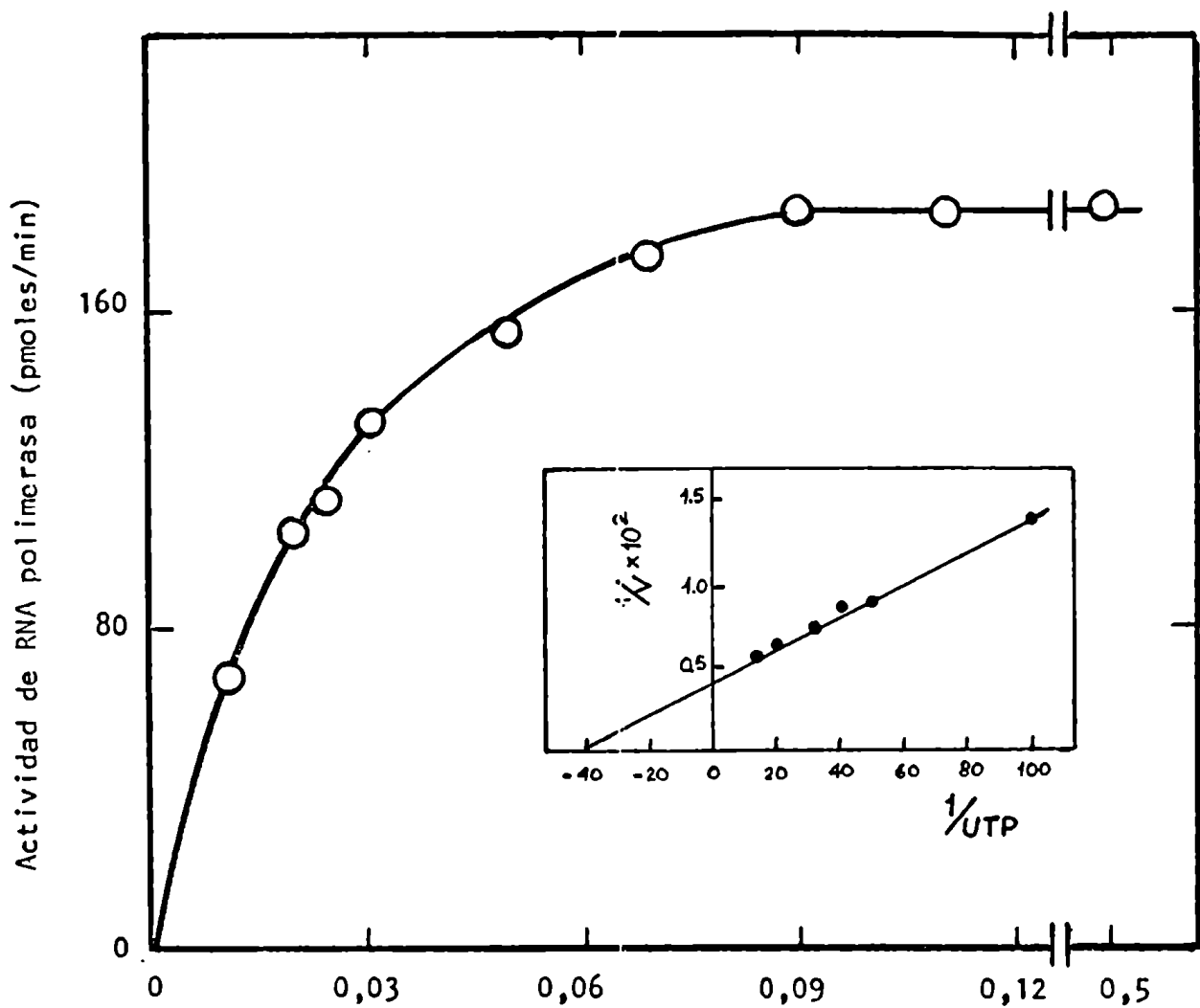


Figura 5: Efecto de la concentración de UTP sobre la actividad de la RNA polimerasa I

La RNA polimerasa I fué obtenida de la cromatografía en DEAE-Sephadex como se indica en la Tabla III. La actividad enzimática se determinó como se describe "Métodos" pero a las concentraciones indicadas de UTP y en presencia de 0,5 mM de los restantes nucleósidos trifosfato (ATP, GTP y CTP) y de DNA nativo como templado. La concentración de sulfato de amonio en la mezcla de reacción era de 32 mM. La incorporación de $[^3\text{H}]$ UMP se expresa en Picoles/min y se determinó en incubaciones de 5 min a 37°C, de modo que corresponden a velocidades iniciales (ver Figura 6).-

c) Síntesis de RNA catalizada por las RNA polimerasas en función del tiempo y de la concentración de proteínas

Las RNA polimerasas de eucariotes son altamente inestables, especialmente a bajas concentraciones. Además, las enzimas eluidas de la columna de DEAE-Sephadex están aún impuras (ver PARTE II) y pueden contener inhibidores. Para poder cuantitar los niveles de las RNA polimerasas nucleares es necesario establecer que la actividad de las enzimas parcialmente purificadas muestran siempre relaciones lineales con respecto al tiempo y a la concentración de proteínas. La cinética de la reacción catalizada por las polimerasas I y II se ilustra en la Figura 6.

Para ambas enzimas la incorporación de $[^3\text{H}]$ UMP en RNA es lineal por lo menos hasta los 15 minutos. Muy a menudo después de este tiempo se observa una disminución en la velocidad de síntesis de RNA y la incorporación de nucleótidos no es lineal. Por lo tanto, en todos los ensayos de la actividad enzimática se utilizaron solo períodos cortos de incubación (no más de 10 minutos). La actividad de las RNA polimerasas I y II purificadas por cromatografía en DEAE-Sephadex, también aumenta linealmente con la concentración de proteínas (Figura 7). Resultados similares a los ilustrados en las Figuras 6 y 7 se obtuvieron con las enzimas extraídas de células incubadas en diferentes condiciones fisiológicas (resultados no mostrados). Por el contrario, la actividad de las RNA polimerasas (I y II) en los extractos nucleares crudos (Fracción F2) no es lineal con respecto a la concentración de proteínas, presumiblemente debido a la presencia de inhibidores no específicos (datos no mostrados). Por lo tanto, los extractos nucleares crudos no constituyen una fracción apropiada para la exacta cuantitación de los niveles de las polimerasas solubles.

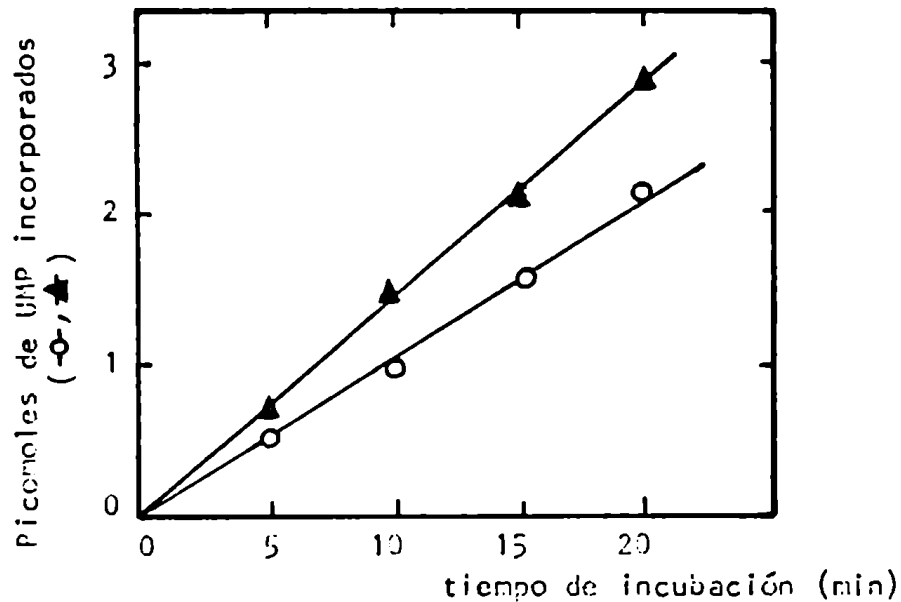


Figura 6: Cinética de la reacción de las RNA polimerasas I y II

La fracción F₂, correspondiente a 1 g de células, se cromatógrafió en DEAE-Sephadex como se describe en la Figura 3. Las fracciones correspondientes a los picos de actividad de las enzimas I y II se reunieron separadamente y la actividad de RNA polimerasa se determinó tomando alícuotas de 20 μ l y usando DNA denaturalizado. La concentración de sulfato de amonio en la mezcla de reacción era de 30 mM para la polimerasa I (○—○—○) y de 80 mM para la polimerasa II (▲—▲—▲).

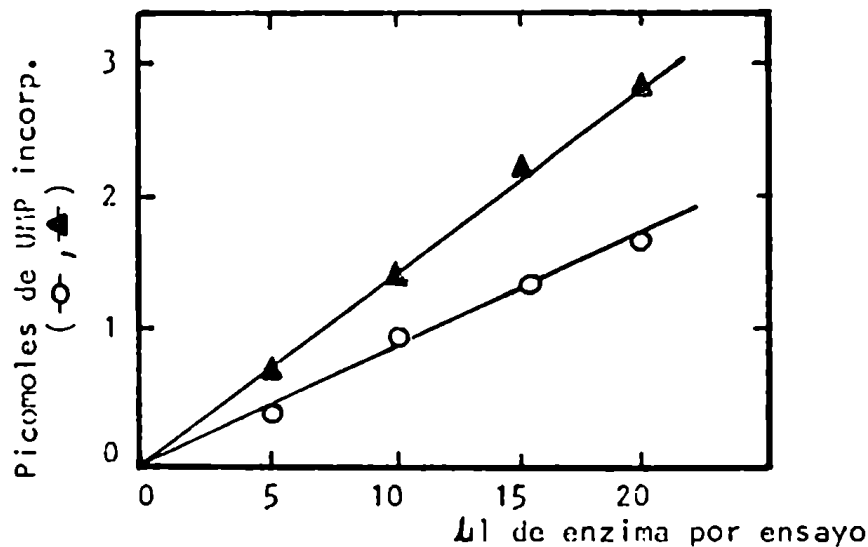


Figura 7: Actividad de las RNA polimerasas en función de la concentración de proteínas.

Las RNA polimerasas I y II se obtuvieron de la cromatografía en DEAE-Sephadex como se indica en la Figura 6 y su actividad se determinó en el volumen standard de 50 μ l como se describe en "Métodos". El templado utilizado y concentración de sulfato de amonio en la mezcla de reacción se indican en la Figura 6. Los volúmenes de reacción, concentraciones de sulfato de amonio y de sero albúmina bovina se mantuvieron constantes mediante la adición de la cantidad apropiada de Buffer A conteniendo sero albúmina bovina y ajustado a la misma concentración salina que las fracciones de las enzimas. Veinte μ l de las fracciones de las polimerasas I y II contenían aproximadamente 4,8 μ g y 3 μ g de proteína endógena respectivamente. (○—○—○) Actividad de RNA polimerasa I, (▲—▲—▲) actividad de RNA polimerasa II.

d) Sensibilidad a la α -amanitina

Como se indica en la Figura 3 la enzima I no es inhibida por la α -amanitina aún a concentraciones tan elevadas como 200 $\mu\text{g/ml}$. La polimerasa II exhibe la clásica curva de sensibilidades a la α -amanitina descrita para la enzima II de otras células de mamífero. (Lindell y col, 1970; Weinmann y Roeder, 1974; Weil y Blatti, 1975) con un 50 % de inhibición de la actividad a una concentración de 0,02 $\mu\text{g/ml}$ de la droga.

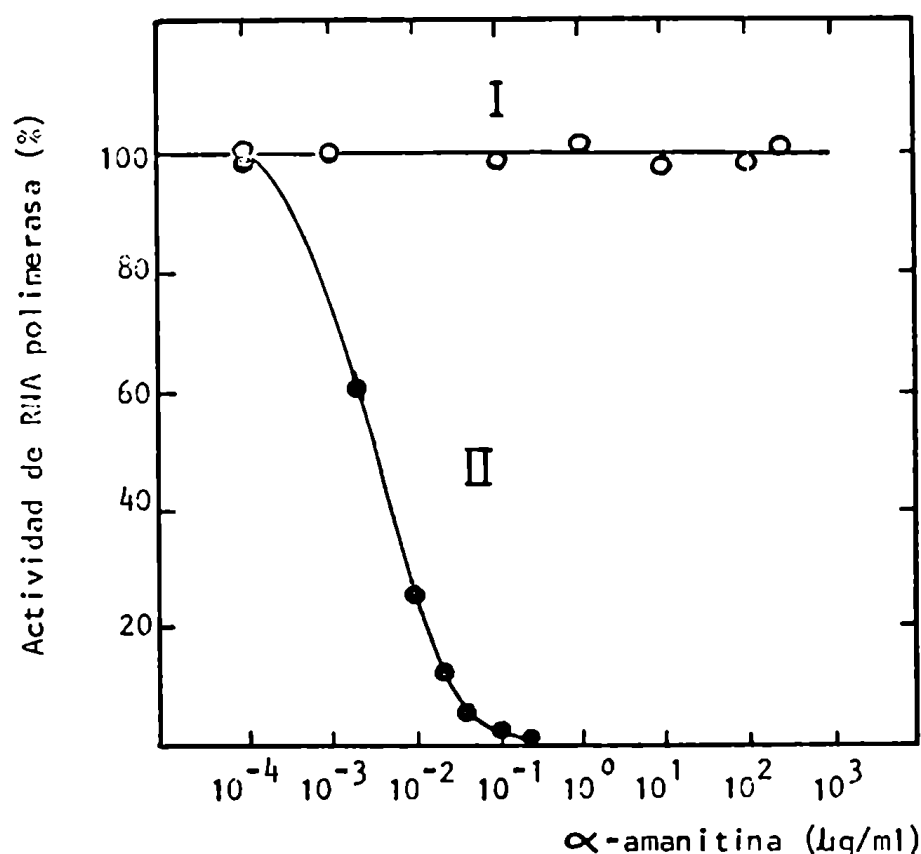


Figura 3: Efecto de la α -amanitina sobre la actividad de las RNA polimerasas I y II

Las RNA polimerasas I y II se obtuvieron de la cromatografía en DEAE-Sephadex como se describe en la Tabla III y su actividad se determinó como se indica en la Tabla IV. La concentración de α -amanitina (premezclada con la enzima a 0°C , antes de la adición de los sustratos y el templado) fué variada como se indica. La actividad de RNA polimerasa se expresa como porcentaje de la actividad determinada en ausencia de α -amanitina. La actividad máxima (100 %) representa la incorporación de 305 y 473 picomoles/ml de UMP en 10 min para las polimerasas I ($\circ-\circ-\circ$) y II ($\bullet-\bullet-\bullet$) respectivamente.

e) Requerimientos de cationes divalentes

Las curvas de activación con Mn^{++} y Mg^{++} , de cada una de las enzimas se ilustran en la Figura 9. Ambas formas de enzima exhiben máxima actividad con Mn^{++} a una concentración de 1,5-2 mM, mientras la actividad óptima con Mg^{++} se mantiene sobre un amplio rango de concentración. Sin embargo, las relaciones de actividad Mn^{++}/Mg^{++} a la concentración óptima de cada ion muestran diferencias significativas, siendo de aproximadamente 3 y 10 para las RNA polimerasas I y II respectivamente. Valores similares han sido indicados para las enzimas análogas de otras células eucarióticas (Blatti y col, 1970; Chambon, 1974; Rutter, 1975)

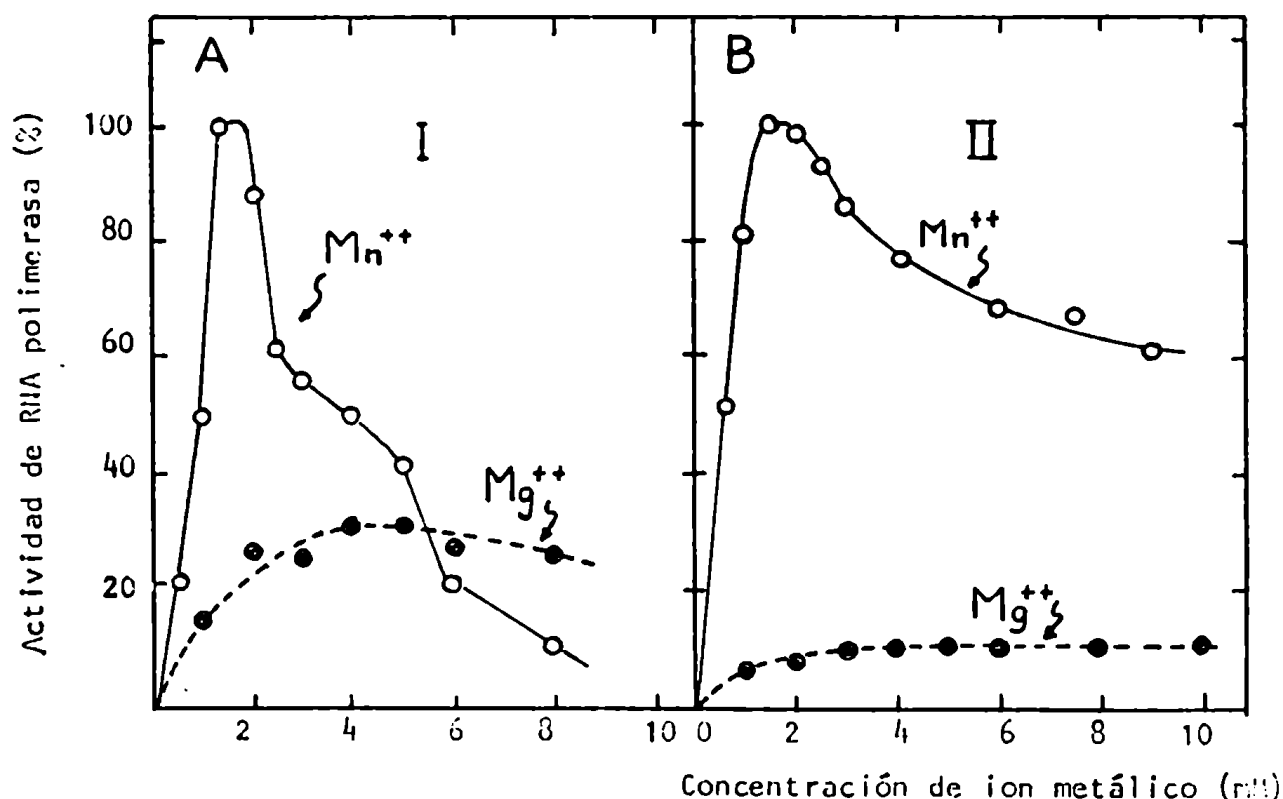


Figura 9: Efecto de la concentración de iones metálicos divalentes sobre la actividad de las RNA polimerasas.- Para estos estudios

y los descriptos en la Figura 10 las preparaciones de cada una de las enzimas purificadas por DEAE-Sephadex fueron dializadas contra Buffer B conteniendo 0,03M sulfato de amonio para eliminar los iones Mg^{++} y disminuir la concentración salina. Exceptuando la concentración del ión metálico, que es la que se indica, la actividad se determinó como en la Tabla IV. La máxima actividad (con Mn^{++} en ambos casos) representa la incorporación de 346 y 820 picomoles de UMP por ml en 10 min para las RNA polimerasas I (Parte A) y II (Parte B) respectivamente.

f) Efecto de la fuerza iónica

Las RNA polimerasas I y II de los diversos sistemas de eucariotes estudiados exhiben curvas de activación salina diferentes (Roeder y Rutter, 1969; Jacob, 1973; Schwartz y col, 1974). Similares resultados se encontraron con las RNA polimerasas de células de tumor ascítico de Ehrlich. En la Figura 10 se ilustra el efecto de concentraciones crecientes de sulfato de amonio sobre la actividad de las RNA polimerasas. Con DNA nativo como templado la forma I exhibe la actividad óptima a una concentración de sulfato de amonio de 40 mM, mientras la forma II, con DNA denaturalizado como templado, muestra un óptimo a 100 mM de la sal.

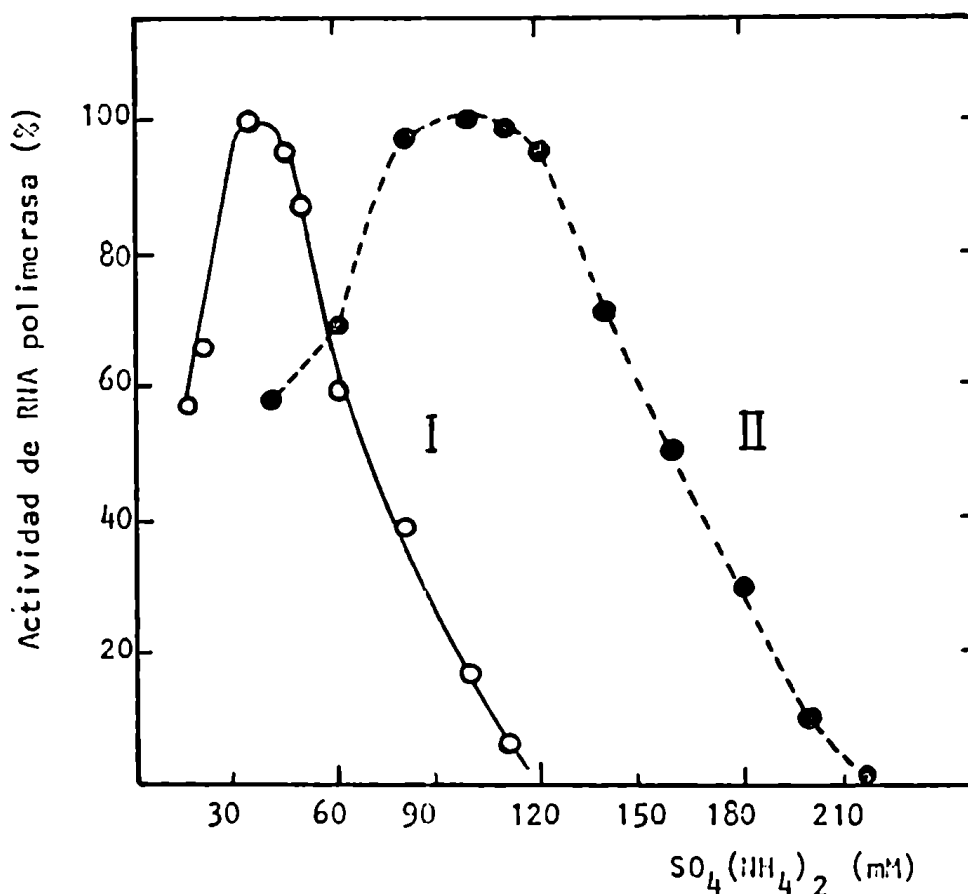


Figura 10: Efecto de la concentración de sulfato de amonio sobre la actividad de las RNA polimerasas.- Las preparaciones de las RNA polimerasas I y II fueron dializadas como se describe en la Figura 9. Exceptuando la concentración de sulfato de amonio que es la que se indica, la actividad de RNA polimerasa se determinó como en la Tabla IV. La actividad máxima (100 %) representa la incorporación de 234 y 370 picomoles de UMP por ml en 10 min para la RNA polimerasas I ($\circ-\circ-\circ$) y II ($\bullet-\bullet-\bullet$) respectivamente.

g) Preferencias de templado

Las RNA polimerasas purificadas por cromatografía en DEAE-Sephadex exhiben un absoluto requerimiento de un templado exógeno (Tabla IV). La Figura 11 ilustra las curvas de saturación de las enzimas con DNA nativo y denaturalizado de timo de ternero. La RNA polimerasa I transcribe más eficientemente el DNA nativo que el denaturalizado, mientras lo contrario ocurre con la polimerasa II. La relación de actividad DNA nativo / DNA de naturalizado a saturación de templado es de 2,2 para la enzima I y de 0,2 para la enzima II. Las curvas de saturación de templado muestran que hay inhibición a concentraciones mayores de 0,3 mg/ml para las dos formas de enzima (datos no mostrados). Similares re sultados se han indicado para las RNA polimerasas de bazo de ratón inyectado y no inyectado por el virus de leucemia (Sethi y Gallo, 1975). Otros templados, en cantidades no limitantes, como el poli A, poli A-oligo dT y el DNA de timo de ternero "activado" ** son transcritos pobremente por ambas enzimas (datos no mostrados).

** El DNA de timo de ternero "activado" fué preparado como lo describe Franze-Fernández y col, (1975).

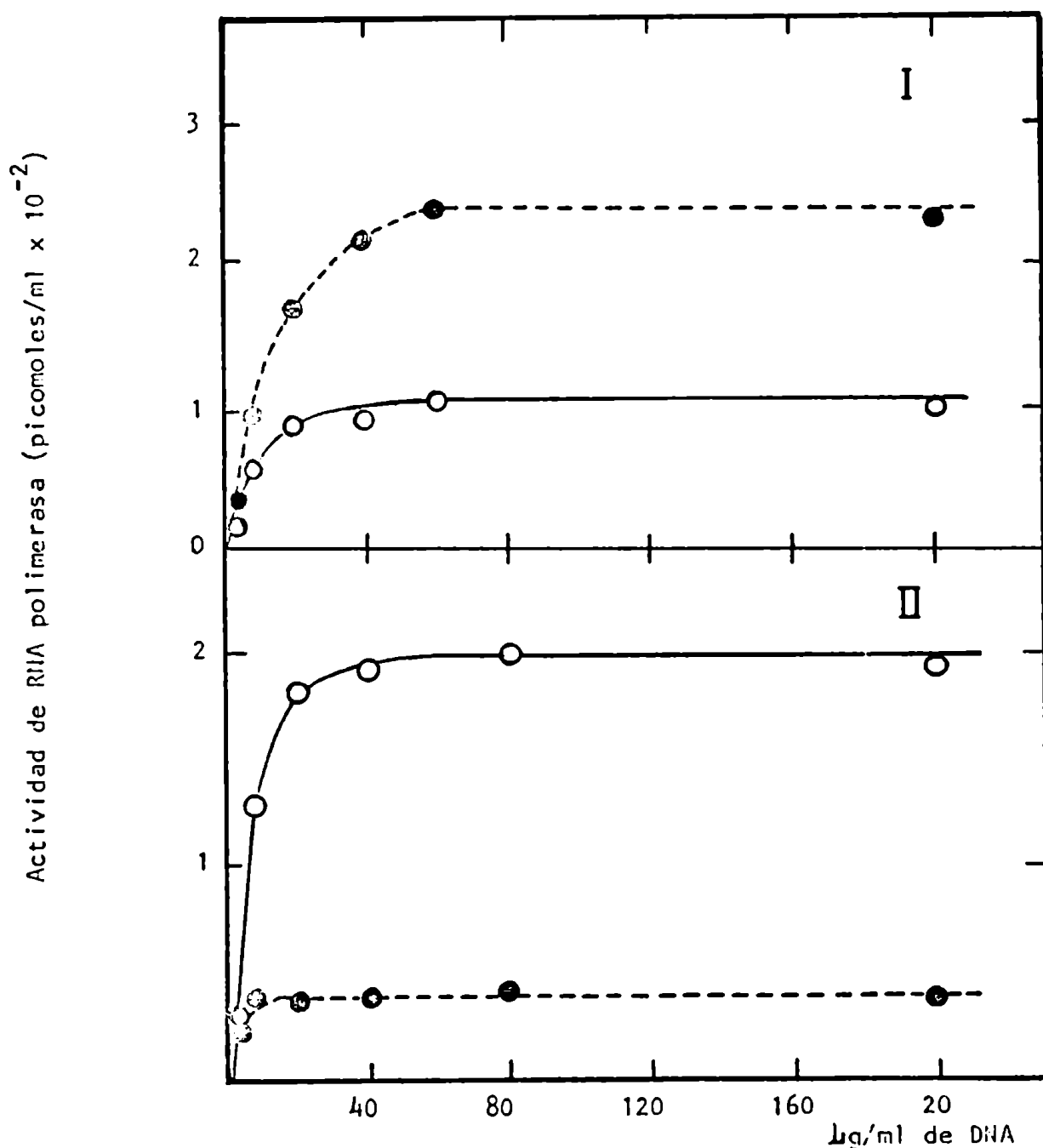


Figura 11: Transcripción relativa del DNA nativo y denaturalizado por las RNA polimerasas I y II. - Las RNA polimerasas I y II se obtuvieron de la cromatografía en DEAE-Sephadex como se describe en la Tabla III. El DNA de timo de ternero fué preparado en una solución conteniendo 0,05 M de Tris HCl pH 7.9 y 0,05 M de KCl y denaturalizado por calentamiento durante 10 minutos a 98°C y enfriamiento rápido en un baño de hielo-sal. Exceptuando la concentración y el estado del templado, la actividad de RNA polimerasa se determinó como se indica en la Tabla IV y se expresa en picomoles por ml de UMP incorporados en 8 minutos. (●—●) DNA nativo. (○—○) DNA denaturalizado.

h) Sensibilidad térmica de las RNA polimerasas

Shields y Tata (1973) encontraron que las RNA polimerasas de hígado de rata exhibían una sensibilidad térmica diferencial siendo la forma I más termolábil que la II. Estos resultados fueron confirmados en otros sistemas de eucariotes (Somers y col, 1975) y proporcionan una evidencia posterior distintiva de las RNA polimerasas I y II. El efecto del precalentamiento de las enzimas durante 10 minutos a diferentes temperaturas se ilustra en la Figura 12. Mientras la RNA polimerasa I retiene sólo el 15 % de su actividad inicial después del precalentamiento durante 10 minutos a 43°C, la polimerasa II retiene el 45 % de su actividad inicial y sólo a temperaturas superiores a 51°C es rápidamente inactivada. Resultados similares se obtuvieron con las RNA polimerasas de hígado de rata (Shields y Tata, 1973) y de células L 6 (Somers y col, 1975).

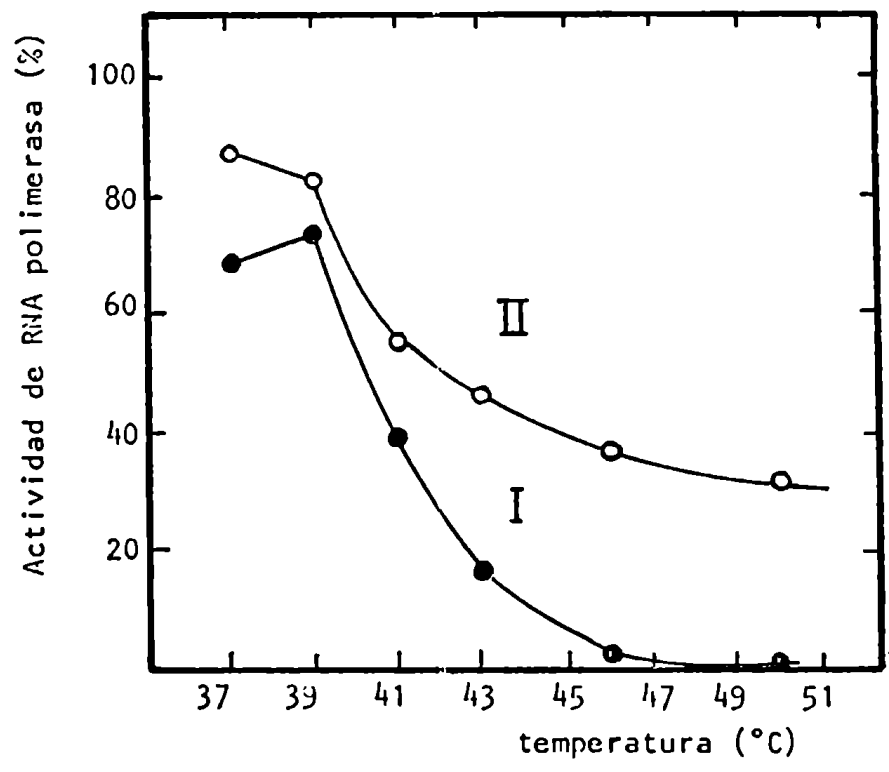


Figura 12: Sensibilidad térmica de las RNA polimerasas.- Las polimerasas I y II se obtuvieron de la cromatografía en DEAE-Sephadex como se indica en "Metodos". Alícuotas de 100 µl de las preparaciones de cada una de las enzimas conteniendo 1,25 mg/ml de albúmina fueron incubadas a las temperaturas indicadas durante 10 minutos y luego enfriadas rápidamente en un baño de hielo y//

//agua. La actividad remanente fue determinada como se indica en "Métodos" utilizando DHA nativo como templado para la forma I (●—●—●) y DHA denaturalizado para la forma II (○—○—○). La concentración de sulfato de amonio en la mezcla de reacción era de 30 mM y 70 mM para las polimerasas I y II respectivamente. La actividad se expresa como porcentaje de la actividad enzimática no sometida a precalentamiento. 100% representa la incorporación de 304 y 329 piconoles/ml de UTP en 10 min para las enzimas I y II respectivamente.

i) Efecto de iones fosfato sobre la síntesis de RNA catalizada por las RNA polimerasas I y II

En timo de ternero (Gissinger y col, 1974) y en otras células de eucariotes (Somers y col, 1975) se ha demostrado que la polimerasa I es más sensible que la polimerasa II a la inhibición por fosfato de potasio. Similares resultados se obtuvieron con las RNA polimerasas I y II de células de tumor ascítico de Ehrlich (Tabla V).

TABLA V : Efecto de iones fosfato sobre la síntesis de RNA catalizada por las RNA polimerasas I y II

Enzima	Síntesis de RNA %				
	Concentración de Fosfato de potasio (mM)				
	0	5	10	15	20
RNA polimerasa I	100	66	62	44	35
RNA polimerasa II	100	100	100	72	61

- La actividad de las enzimas I y II obtenidas de la cromatografía en DEAE Sephadex se determinó como se indica en la Tabla IV en ausencia y presencia de las cantidades indicadas de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}_3\text{H}_2\text{O}$ (pH 8). La síntesis resi -

//dual de RNA se expresa como porcentaje de la actividad medida en ausencia de fosfato -100 % representa la incorporación de 298 y 310 Pi^- comoles/ml de UMP en 10 min para las polimerasas I y II respectivamente.

j) Comparación de las propiedades de las RNA polimerasas I y II de células de tumor ascítico de Ehrlich

Un resumen de las propiedades de las RNA polimerasas DNA dependientes de células de tumor ascítico de Ehrlich se muestra en la Tabla VI. Las propiedades de las enzimas de estas células tumorales son similares a las descritas para las RNA polimerasas I y II de otras células de mamífero (Roeder y Rutter, 1969; Blatti y col, 1970; Jacob, 1973).

TABLA VI : Comparación de las propiedades de las RNA polimerasas I y II de células de tumor ascítico de Ehrlich

Propiedad	RNA polimerasa	
	I	II
Elución de DEAE-Sephadex (mM de sulfato de amonio)	70 - 90	220 - 250
Fuerza iónica óptima (mM de sulfato de amonio)	40	100
Relación de actividad $\frac{Mn^{++}}{Mg^{++}}$	3	10
Relación de actividad $\frac{DNA \text{ nativo}}{DNA \text{ denaturalizado}}$	2,2	0,2
Sensibilidad a la α -amanitina	insensible	sensible
Concentración de α -amanitina para el 50% de inhibición ($\mu g / ml$)	insensible	0,02

6.- DISCUSION

En esta sección se ha descrito la purificación parcial y las propiedades de las RNA polimerasas DNA dependientes de células de tumor ascítico de Ehrlich. Las enzimas fueron solubilizadas de los núcleos aislados por sonicación a alta fuerza iónica y parcialmente purificadas por precipitación con sulfato de amonio y cromatografía en DEAE-Sephadex. Dos formas de enzimas designadas I y II, fueron re sueltas por cromatografía en DEAE-Sephadex. La enzima I es insensible a la α -amanitina, mientras la II es totalmente inhibida por muy bajas concentraciones de esta toxina. Ambas enzimas exhiben todas las propiedades de verdaderas RNA polimerasas DNA-dependientes pues requieren DNA y los cuatro ribonucleósidos trifosfato para la síntesis de productos digeribles por RNasa. Las RNA polimerasas I y II de células de tumor ascítico de Ehrlich son similares a las enzimas análo gas de otras células de eucariotes con respecto a sus propiedades cromatográficas, sensibilidad a la α -amanitina, fuerza iónica óptima, activación por cationes divalentes y afinidad hacia distintos templa dos (Roeder y Rutter, 1969; Blatti y col, 1970; Jacob, 1973; Chambon y col, 1974). Las dos enzimas exhiben una sensibilidad térmica diferen cial, siendo la forma I mas termolábil que la II. En este sentido se asemejan a las enzimas análogas de hígado de rata (Shields y Tata, 1973) y de células L6 (Samers y col, 1975) pero difieren de las de células KB (Sergeant y Krsmanovic, 1973).

Nuestros resultados no coinciden con los de Blair y Dommasch (1973), quienes estudiando las RNA polimerasas de células de tumor ascítico de Ehrlich obtuvieron dos formas de RNA polimerasa II por cromatografía en DEAE-Sephadex. Una posible explicación de esta discrepancia es que estos autores utilizan un gradiente discontinuo para resolver las enzimas. Es te gradiente, como se sabe, puede producir artefactos de elución (Peter son, 1970).

En hígado de ratón adulto (Versteegh y Warner, 1973) y en ciertos estudios realizados en hígado de rata (Sajdel y Jacob, 1971), se ha descrito una segunda forma de RNA polimerasa I que eluye en el volumen de

exclusión en la cromatografía en DEAE-Sephadex. En células de tumor ascítico de Ehrlich ocasionalmente observamos un pico de actividad con las características de la RNA polimerasa I en el volumen de exclusión. Este pico fue observado cuando las preparaciones enzimáticas se dializaban antes de la cromatografía, en lugar de diluirlas para disminuir la concentración salina como se hacía habitualmente. También se lo encontró cuando los núcleos se sonicaban deficientemente. En estas circunstancias no hay una buena eliminación de los ácidos nucleicos (datos no mostrados). Estos resultados sugirieron que la actividad de RNA polimerasa I que eluye en el volumen de exclusión puede deberse a la presencia de ácidos nucleicos contaminantes o a diferentes estados de agregación de la enzima con otras proteínas celulares.

En células de tumor ascítico de Ehrlich no encontramos evidencias de actividad de RNA polimerasa III. Esta forma de enzima tampoco fué detectada en los núcleos aislados, ni en los homogenatos celulares totales (resultados no mostrados) de estas células. Es probable que la ausencia de RNA polimerasa III en nuestras preparaciones esté relacionada a los bajos niveles de actividad y/o a la gran inestabilidad de esta enzima que escapa a nuestras posibilidades de detección.

EFFECTO DE DIVERSOS AGENTES SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA R_{NA} POLIMERASA I DE CELULAS DE TUMOR ASCITICO DE EHRLICH

1.- Efecto de la privación de amino ácidos, pactamicina y toyocamicina sobre la actividad de la R_{NA} polimerasa I en los núcleos aislados.

La síntesis de rRNA y la actividad de la R_{NA} polimerasa I en los núcleos aislados de células de tumor ascítico de Ehrlich es muy sensible a la concentración de amino ácidos del medio de cultivo (Franze-Fernández y Pogo, 1971) y a la inhibición de la síntesis de proteínas por drogas como la cicloheximida y la pactamicina (Franze-Fernández y Sangüesa, 1973; Franze-Fernández y Sangüesa, 1975). Ciertos nucleósidos antibióticos, como la toyocamicina, también afectan la actividad de la enzima I en los núcleos aislados pero por un mecanismo distinto, ya que esta droga no inhibe la síntesis proteica (Iapalucci-Espinoza y col, en prensa).

La Figura 13 muestra la rápida disminución en la actividad de la R_{NA} polimerasa I en los núcleos aislados luego de la adición de pactamicina o toyocamicina a células previamente activadas por amino ácidos o de transferir las células a medios privados de amino ácidos.

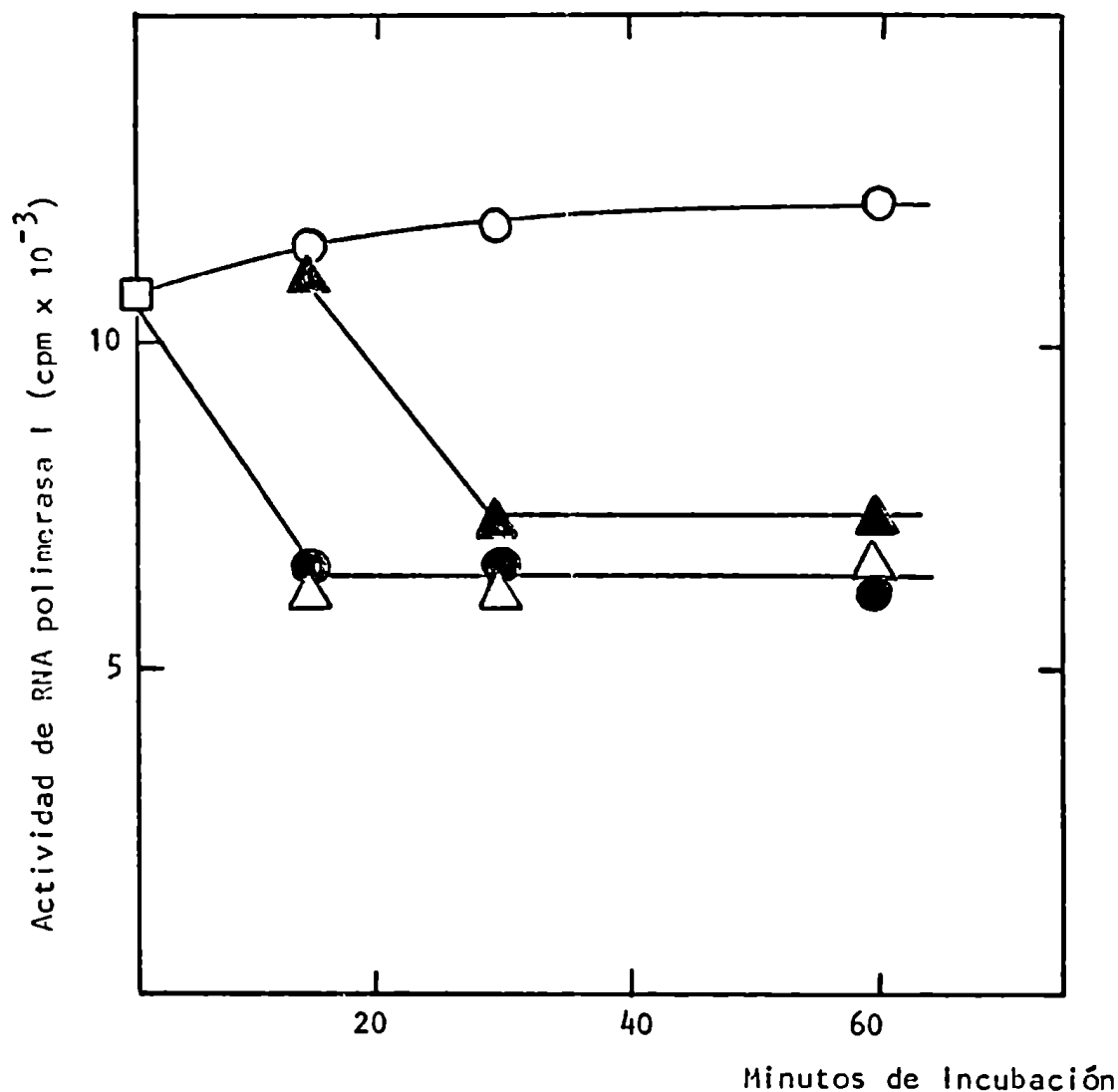


Figura 13: Efecto de la privación de amino ácidos, pactamicina y toyocamicina sobre la actividad de la RNA polimerasa I en los núcleos aislados. Las células se preincubaron 60 minutos en un medio sin amino ácidos. Luego las células fueron colectadas por centrifugación, resuspendidas en un medio completo e incubadas durante otros 60 minutos. Al cabo de este tiempo se aislaron los núcleos de una alícuota de la suspensión celular y se determinó la actividad de la RNA polimerasa I. Este valor corresponde a tiempo cero (□). Las células del incubato restante se colectaron por centrifugación y se resuspendieron en un medio completo (○-○-○), en un medio completo conteniendo 2 μM de toyocamicina (▲-▲-▲), en un medio completo con 0,25 μg/ml de pactamicina (△-△-△) y en un medio sin amino ácidos (●-●). La incubación fué continuada durante los tiempos indicados. A dichos tiempos se aislaron los núcleos y se determinó la actividad de RNA polimerasa I. Las determinaciones se realizaron a baja fuerza iónica y en presencia de 3 μg/ml de α-amanitina y 0,400 mg/ml de heparina.

2.- Efecto de la privación de amino ácidos, pactamicina y toyocamicina sobre la actividad de la RNA polimerasa I parcialmente purificada.

En neto contraste con las rápidas fluctuaciones observadas en la actividad endógena de la RNA polimerasa I en los núcleos aislados, los resultados de la Tabla VII indican que la privación de los amino ácidos o el tratamiento de las células con toyocamicina o pactamicina no ejercen ningún efecto sobre los niveles de actividad soluble de esta enzima detectados con un templado de DNA exógeno en los extractos nucleares (F2) o después de la purificación por cromatografía en DEAE-Sephadex (Tabla VII).

Por otra parte, la actividad de la RNA polimerasa II en los núcleos aislados (datos no mostrados) y los niveles de actividad soluble de esta enzima no se modifican por la inhibición de la síntesis de proteínas o la transferencia de las células a un medio carente de amino ácidos (Tabla VII).

Es evidente de los resultados de la Tabla VII que la cantidad de RNA polimerasa I no es el factor limitante en la síntesis del rRNA. Entonces, la unión de la enzima al templado de DNA nuclear y/o el funcionamiento ó actividad de la enzima unida a éste son los aspectos de la maquinaria sintética de RNA que están bajo control regulatorio.

TABLA VII : Niveles de actividad de las RNA polimerasas solubles de células transferidas a un medio con pactamicina, sin amino ácidos o con toyocamicina.

Etapa de Purificación	Actividad de RNA polimerasa Pmoles/g de cél.			
	I		II	
A	Control	+Pactamicina	Control	+Pactamicina
Fracción F2	2046	2148	5670	5200
DEAE-Sephadex	2020	2000	3600	3300
B	Control	Sin amino ácidos	Control	Sin amino ácidos
Fracción F2	3560	3570	4994	5482
DEAE-Sephadex	3600	3200	3975	4230
C	Control	+Toyocamicina	Control	+Toyocamicina
Fracción F2	3190	2983	-	-
DEAE-Sephadex	3241	2971	-	-

A: Las células se preincubaron 90 min en un medio completo. Al cabo de ese tiempo se aislaron los núcleos de una alícuota de la suspensión de células y se purificaron las RNA polimerasas por el procedimiento descrito en "Métodos" (Control). Al incubato restante se le adicionó 0,25 µg/ml de pactamicina y la incubación se continuó durante 60 min. Después de ese tiempo se procedió a purificar las RNA polimerasas.

B: El control de este experimento se realizó como en A. Las células del incubato restante se colectaron por centrifugación, se resuspendieron en un medio sin amino ácidos y se incubaron por otros 70 min. Al cabo de ese tiempo se aislaron los núcleos y se purificaron las RNA polimerasas.

C: Las células se preincubaron en un medio sin amino ácidos durante 75 min. Al cabo de este tiempo se tomaron alícuotas iguales de la suspensión celular, se centrifugaron y resuspendieron en un medio completo (Control) o en un medio completo conteniendo 2 µM de toyocamicina. La incubación se continuó por un período adicional de 75 min.

Luego se aislaron los núcleos y purificaron las RNA polimerasas. La actividad de RNA polimerasa se determinó a 0,10 mM de UTP, 0,04-0,06M de sulfato de amonio y con DNA denaturalizado como templado. La actividad de las RNA polimerasas I y II en la Fracción F2 se determinó como describe en la Tabla I. La actividad enzimática está expresada en picomoles totales de UMP incorporados en RNA en 10 min. por gramo original de células.

3.- Propiedades cromatográficas de la RNA polimerasa I: acción de los amino ácidos, inhibidores de síntesis de proteínas y toyocamicina

El perfil típico de elución en la cromatografía en DEAE-Sephadex de las RNA polimerasas extraídas de los núcleos de células tratadas con pactamicina e incubadas en un medio con amino ácidos se ilustra en la Figura 14. Independientemente de las condiciones de incubación de las células, la cromatografía en DEAE-Sephadex resuelve a las RNA polimerasas solubilizadas en sólo dos picos de actividad correspondientes a las formas I y II. Si bien no se observan diferencias en las características de elución de la RNA polimerasa II, puede verse que el pico de actividad de la RNA polimerasa I de células tratadas con pactamicina eluye a una concentración mayor de sulfato de amonio que el de la enzima de núcleos control (Figura 14). Significativamente el mismo corrimiento se encontró en la elución de la enzima I de células incubadas en un medio privado de amino ácidos o en un medio completo con toyocamicina (Figura 15). En base a los resultados de 5 experimentos independientes, se calculó que la RNA polimerasa I extraída de los núcleos con actividad de transcripción disminuída eluye a una concentración de sulfato de amonio $15,5 \pm 3 \text{ ml}^*$ mayor que la enzima aislada de núcleos activos. Esta conducta de la enzima no parece ser el resultado de alteraciones inespecíficas en el procedimiento cromatográfico como lo indican las siguientes evidencias experimentales:

1) En todas las condiciones examinadas no se observaron modificaciones en el perfil de elución de una de las RNA polimerasas de células de tumor ascítico de Ehrlich que eluye en la vecindad de la RNA polimerasa I y que fué utilizada como un marcador interno (indicado por una flecha en la Figura 15).

Un control interno adicional lo proporciona la posición del pico de elución de la RNA polimerasa II que tampoco se modifica por la privación de amino ácidos (datos no mostrados) o la inhibición de la síntesis de proteínas (Figura 14).

* Valor medio + desviación standard.

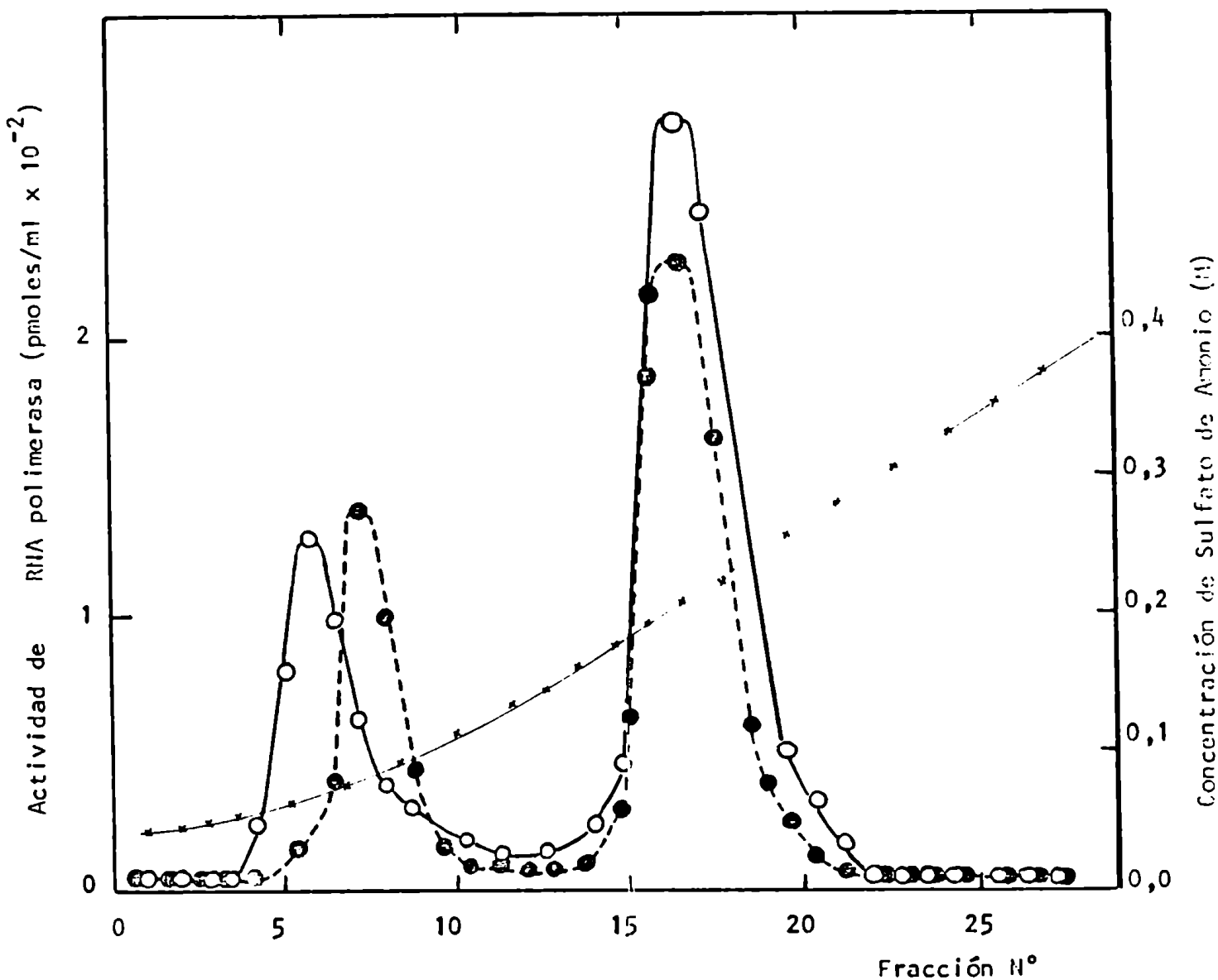


Figura 14: Cromatografía simultánea en DEAE-Sephadex de las RNA polimerasas solubilizadas de células incubadas en un medio completo y en un medio completo con pactamicina. - Las RNA polimerasas se solubilizaron de los núcleos de células incubadas en un medio completo (○-○-○) y transferidas a un medio completo conteniendo pactamicina (●-●-●) como se indica en la Tabla VII: A- Alícuotas de la Fracción F2 correspondientes a 0,3 g de células (12-14 mg de proteína) se cromatografiaron simultáneamente en idénticas columnas de DEAE-Sephadex (0,9 x 7 cm), como se describe en "Métodos". La actividad de RNA polimerasa se determinó como se indica en la Figura 3. (↔↔↔) Concentración de sulfato de amonio.

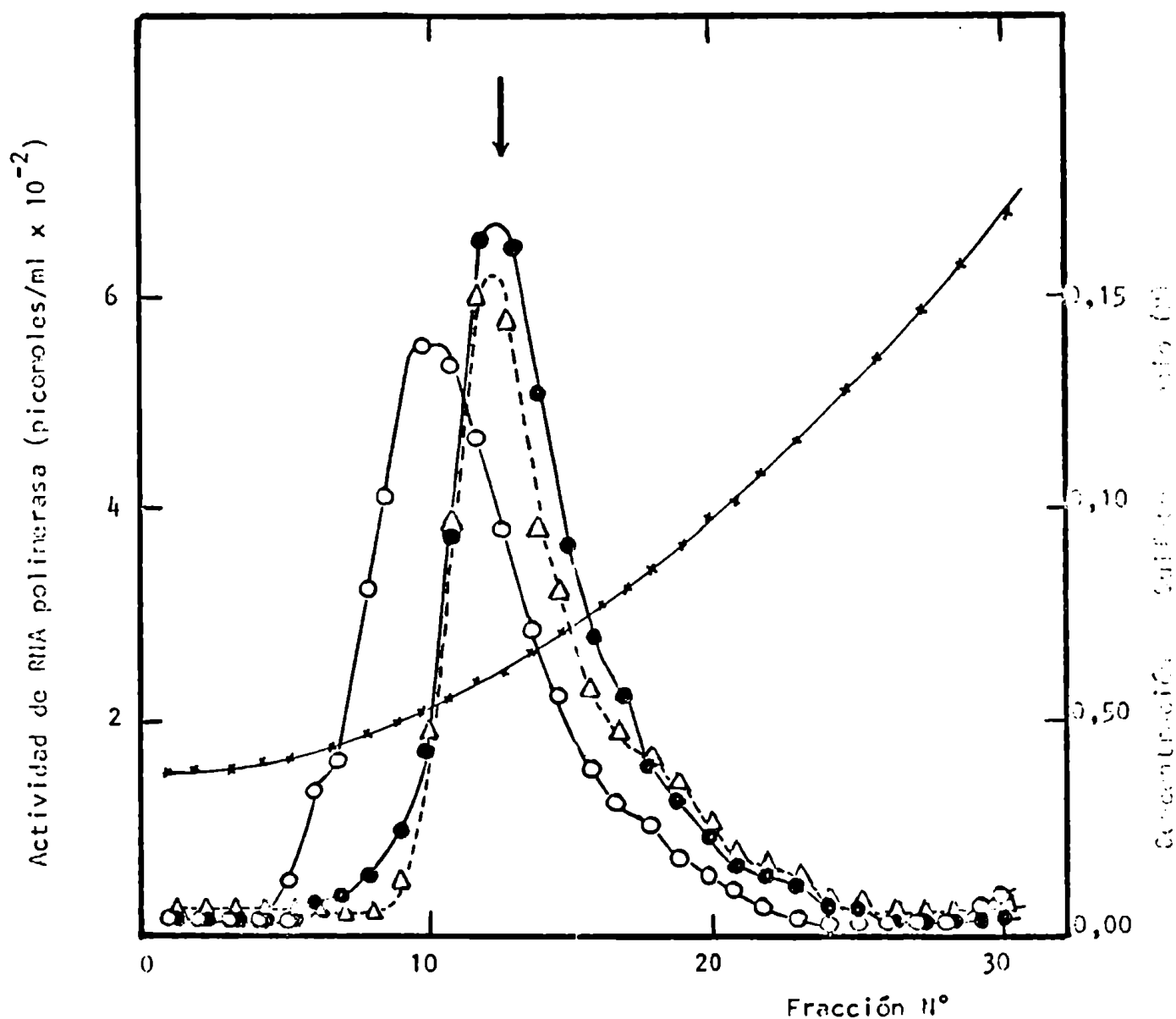


Figura 15: Efecto de la tovacamicina y de la privación de los amino ácidos sobre las características cromatográficas en DEAE-Sephadex de la RNA polimerasa I. Las células fueron preincubadas 60 min. en un medio sin amino ácidos y luego se transfirieron a los distintos medios que se indican más adelante, en los cuales fueron incubadas 75 min. Al cabo de ese tiempo se colectaron las células, se aislaron los núcleos y se purificaron las RNA polimerasas como se describe en "Métodos". Alícuotas de la Fracción F2, correspondientes a 1 g de células incubadas en un medio completo (○—○—○), en un medio completo + 2 µl de tovacamicina (●—●—●) y en un medio sin amino ácidos (△—△—△) se cromatografiaron simultáneamente en idénticas columnas de DEAE-Sephadex (0,9 x 9 cm) como se describe en "Métodos". Las enzimas se eluyeron aplicando un gradiente lineal de sulfato de amonio 0,05 a 0,22 M en Buffer A. Por las características del gradiente utilizado no eluyó la RNA polimerasa II. La actividad de RNA polimerasa se determinó como se indica en la Figura 3, pero usando DNA nativo como templado. La actividad de DNA polimerasa se determinó en alícuotas de 20 µl como se describe en "Métodos". La posición del pico de DNA polimerasa en los diferentes gradientes fue coincidente y se indica por una flecha. (x—x—x) Concentración de sulfato de amonio.

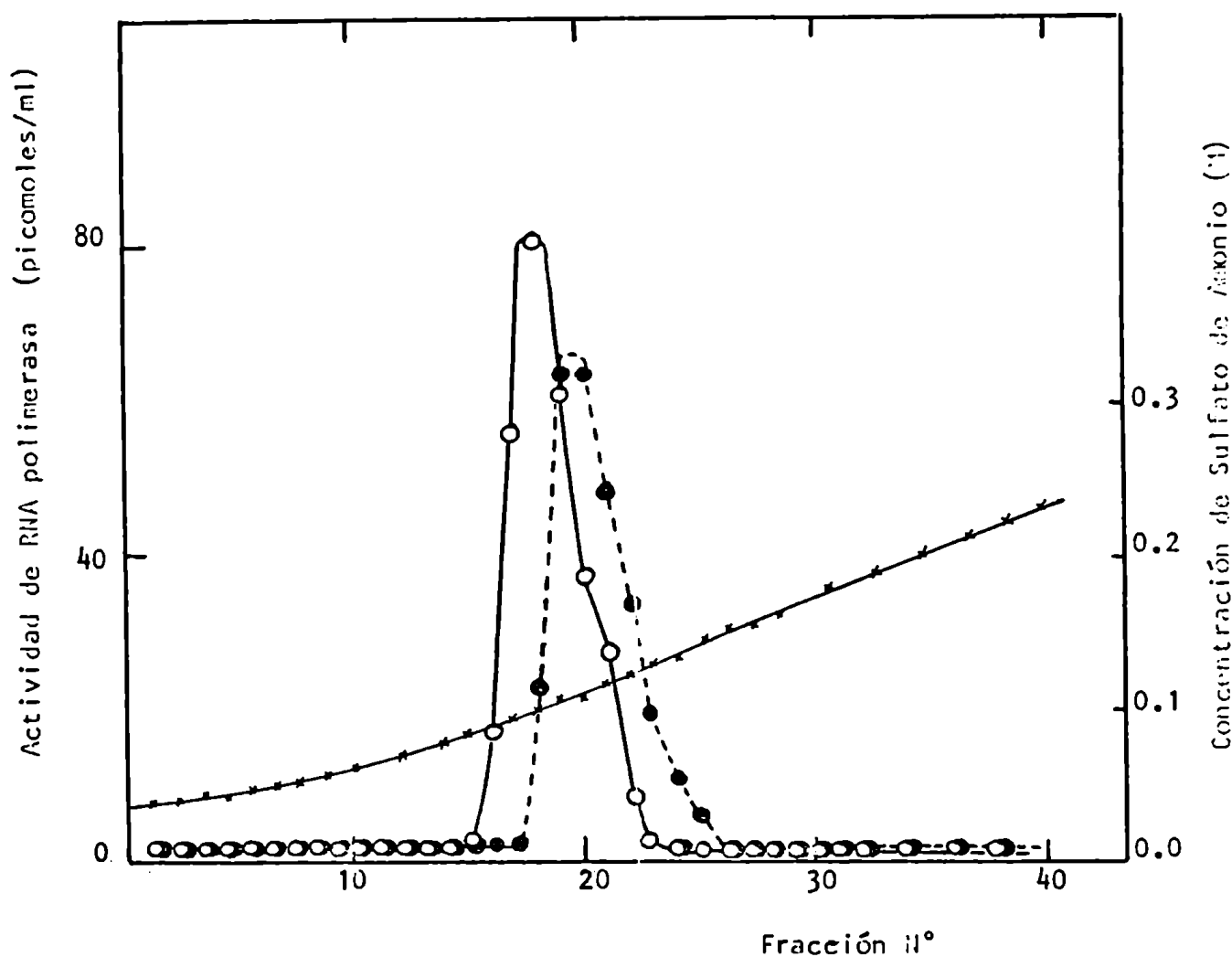


Figura 16: Recromatografía en DEAE-Sephadex de la RNA polimerasa I aislada de células incubadas en un medio completo y en un medio completo con pactamicina. - Las RNA polimerasas se solubilizaron de los núcleos de células incubadas en un medio completo y con pactamicina como se describe en la Tabla VII A. Alícuotas de la Fracción F2 correspondientes a 0,75 g de células se cromatografiaron simultáneamente en DEAE-Sephadex en las condiciones indicadas en la Figura 15. Las fracciones correspondientes a los picos de actividad de la RNA polimerasa I de células control (○—○—○) y tratadas con pactamicina (●—●—●) se reunieron y se recromatografiaron inmediatamente en idénticas columnas de DEAE-Sephadex en las mismas condiciones en que se realizó la primera cromatografía. La actividad de RNA polimerasa se determinó como se indica en la Figura 3. (—+—+—) Concentración de sulfato de amonio.

2) Las características de elución de la RIA polimerasa I extraída de los núcleos de células incubadas con pactamicina y de los correspondientes núcleos control se mantienen después de la recromatografía en DEAE-Sephadex (Figura 16) o cuando la cromatografía en DEAE-Sephadex fué realizada después de soneter a las enzimas solubilizadas a una etapa previa de purificación por sedimentación en gradientes de glicerol (Figuras 17 y 18).

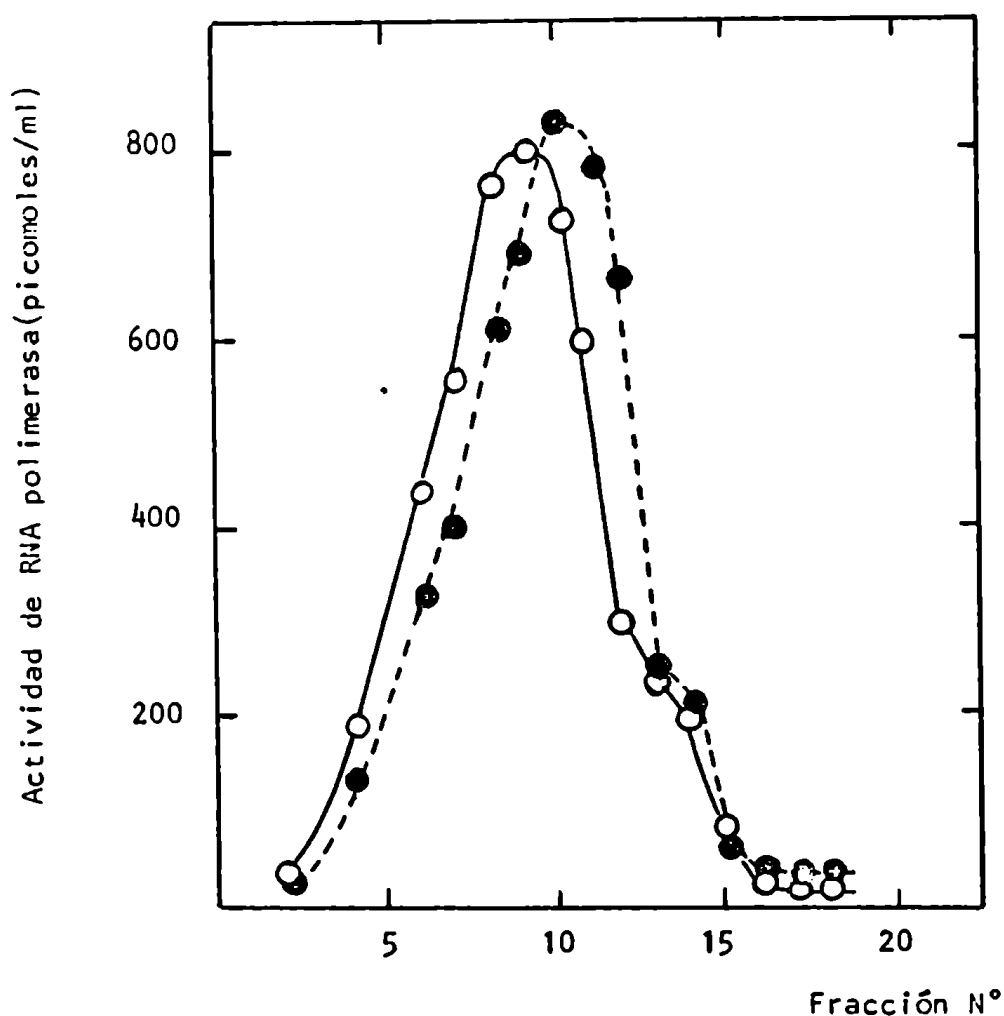


Figura 17: Sedimentación en gradientes de glicerol de las RIA polimerasas solubilizadas de células incubadas en un medio completo y en un medio completo con pactamicina. - Las RIA polimerasas se solubilizaron de los núcleos de células incubadas en un medio completo (○—○—○) y en un medio completo con pactamicina (●—●—●) en las mismas condiciones que se indican en la Tabla VII A. Alícuotas de la Fracción F2 correspondientes a 0,5 g de células (7-8 mg de proteína) fueron sedimentadas en paralelo en gradientes de glicerol (15-30 %) como se describe en "Métodos". La actividad de RIA polimerasa se determinó como se indica en la Figura 3. La concentración de sulfato de amonio en la mezcla de reacción fué de 25 mM.

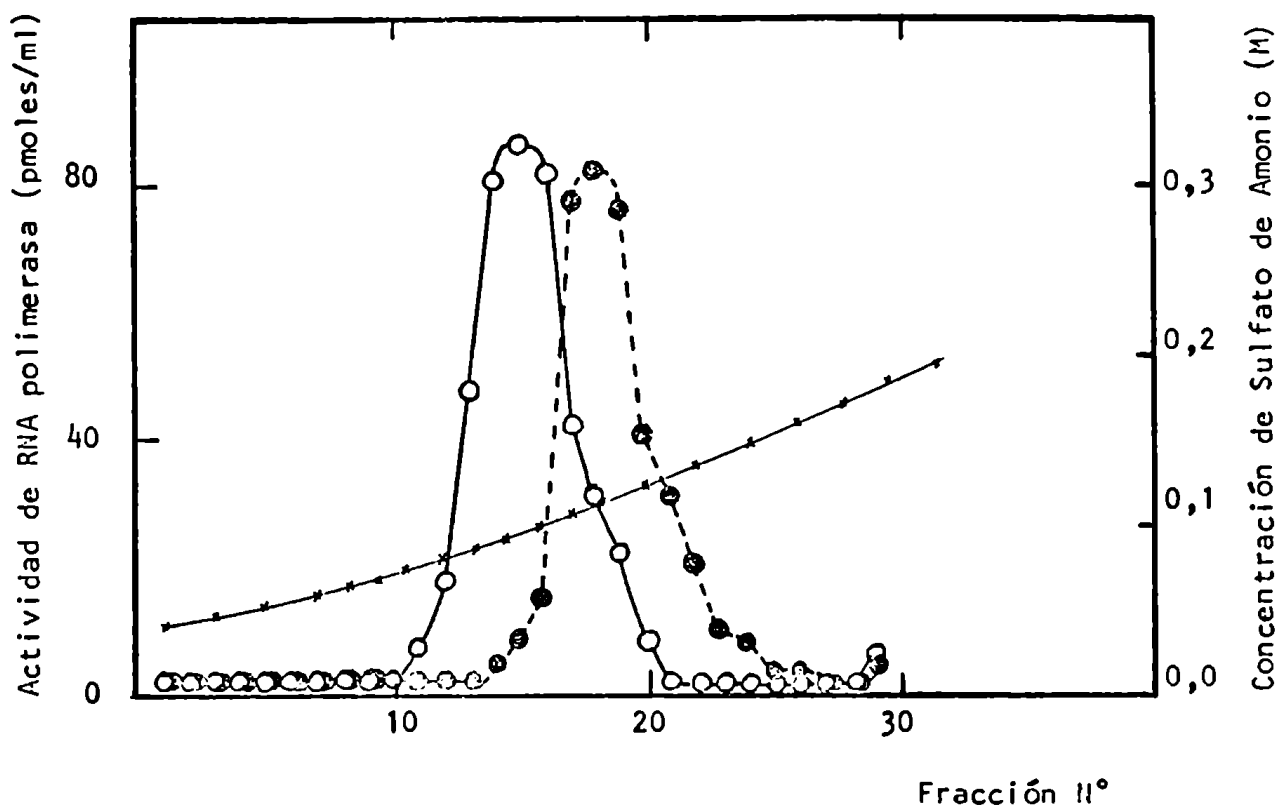


Figura 18: Cromatografía simultánea en DEAE-Sephadex de las RNA polimerasas aisladas de células control y tratadas con pactamicina y purificadas previamente por sedimentación en gradientes de glicerol. Las fracciones con actividad enzimática obtenidas de la sedimentación en cada uno de los gradientes de glicerol ilustrados en la Figura 16 se reunieron separadamente y se aplicaron directamente a idénticas columnas de DEAE-Sephadex (0,9x7,5 cm). Las enzimas se eluyeron aplicando un gradiente lineal de sulfato de amonio 0,05M a 0,22M en Buffer A. Por las características del gradiente no se eluyó a la RNA polimerasa II. La actividad de RNA polimerasa se determinó como se indica en la Figura 3. Actividad de RNA polimerasa I extraída de células incubadas en un medio completo (○—○—○) y en un medio completo con pactamicina (●—●—●). Concentración de sulfato de amonio (—+—+—).

La modificación en la conducta cromatográfica es, hasta ahora, la única diferencia cualitativa que se pudo detectar entre las RNA polimerasas I extraídas de núcleos con distinta capacidad de transcripción del rRNA. Otras propiedades, como preferencias de templado, fuerza iónica óptima y requerimientos de cationes divalentes, son idénticas (resultados no mostrados). Cuando se comparó la estabilidad térmica de las enzimas (en experimentos similares a los descritos en la Figura 12) se encontraron pequeñas diferencias de comportamiento que no pudimos asignarle un valor significativo (resultados no mostrados).

4.- Resolución de dos formas de RNA polimerasa I por cromatografía en Fosfocelulosa.

Por cromatografía en Fosfocelulosa de extractos nucleares de células hepáticas (Chesterton y Butterworth, 1971) y de hepatoma de Novikoff (Froehner y Bonner, 1973) se han resuelto dos formas de RNA polimerasa I, designadas IA y IB (ó AI y AII). Ambas formas de enzima no son separables por cromatografía en DEAE-Sephadex o DEAE-celulosa y exhiben similares propiedades catalíticas (Coupar y Chesterton, 1975). Recientemente se ha especulado que estas dos formas enzimáticas puedan corresponder a dos estados funcionales distintos de la polimerasa I (Chesterton y col, 1975). Una forma, por ejemplo, podría representar a la enzima derivada de los complejos de transcripción, mientras la otra a la enzima libre o disociada del templado. La modulación de la actividad de la RNA polimerasa I se lograría por transición de una forma enzimática en otra. Si esto fuera así, una interconversión de una forma en otra podría ser la causa del diferente comportamiento cromatográfico en DEAE-Sephadex exhibido por la polimerasa I, extraída de núcleos con distinta actividad de transcripción. Con la finalidad de examinar esta posibilidad se analizaron los extractos nucleares de células control y con síntesis proteica inhibida por cromatografía en Fosfocelulosa, en las condiciones descriptas para la resolución de las especies IA y IB de hígado de rata (Chesterton y Butterworth, 1971). En ambos extractos, independientemente de la capacidad de síntesis del rRNA, se encontraron las dos formas de polimerasa I y en la misma proporción (Figura 19). Un resultado similar se obtuvo cuando se cromatografiaron en Fosfocelulosa los extractos nucleares de células incubadas en un medio completo y privadas de amino ácidos (resultados no mostrados). Por lo tanto, si estas dos formas de RNA polimerasa I tienen algún significado biológico, no parece ser el postulado por Chesterton y col, (1975).

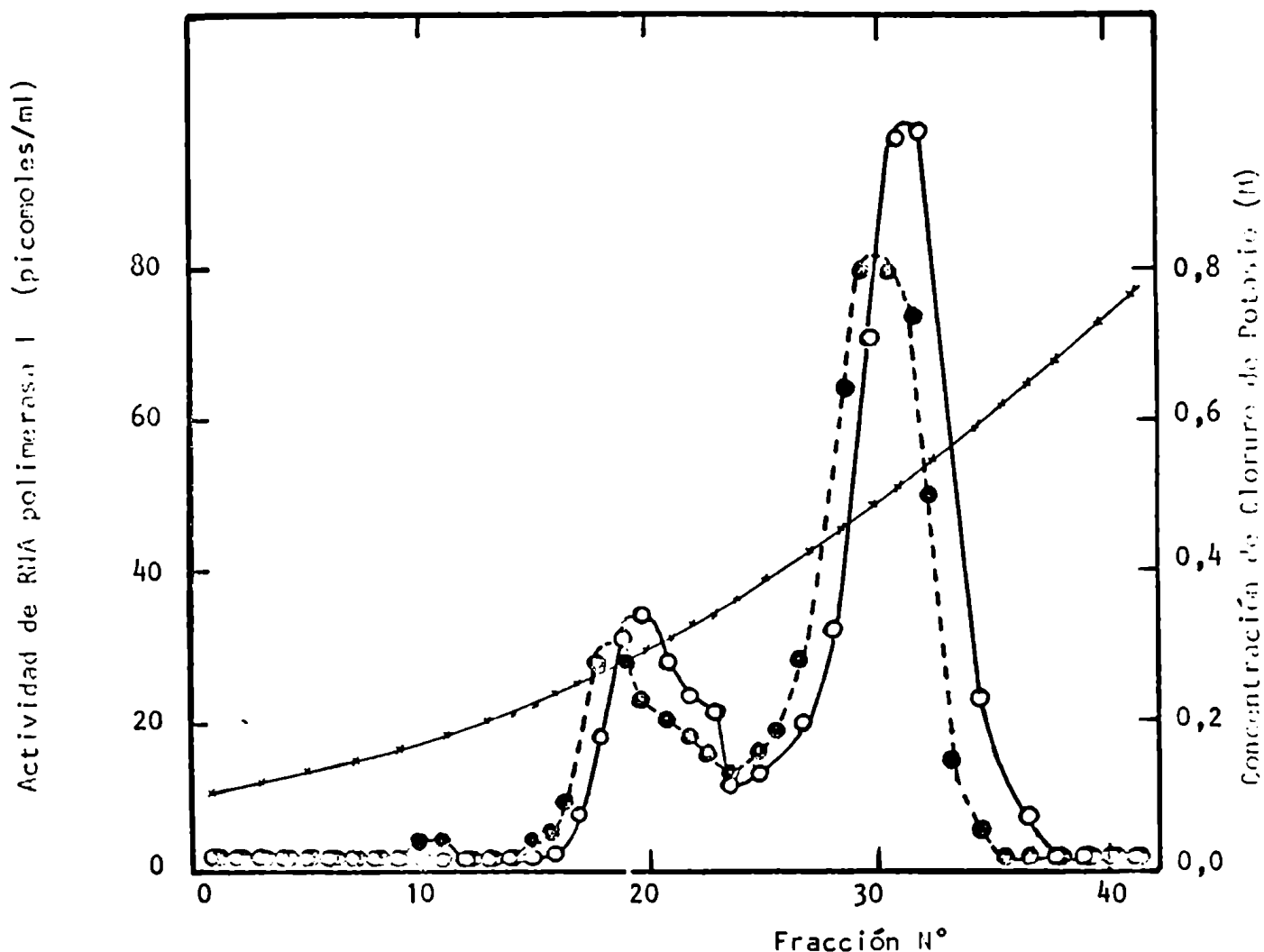


Figura 19: Cromatografía simultánea en Fosfocelulosa de las RNA polimerasas solubilizadas de células incubadas en un medio completo y con pactamicina. - Aliquotas de la Fracción F2 (10-12 ng de proteína) obtenidas de células incubadas en un medio completo (○-○-○) y con pactamicina (●-●-●) como se indica en la Tabla VII A, - se cromatografiaron en idénticas columnas de Fosfocelulosa según se detalla en "Métodos". La actividad de RNA polimerasa se determinó en presencia de 0,01 mM UTP, DNA denaturalizado y 2 μ g/ml de α -amanitina con la finalidad de inhibir a la polimerasa II cuya elución es coincidente con la polimerasa I. La concentración de KCl en la mezcla de reacción fue la resultante de la dilución de alícuotas de 10 μ l de cada una de las fracciones en el volumen final de 50 μ l de la mezcla de reacción indicada en "Métodos". (▲-▲-▲) Concentración de cloruro de potasio.

5.- DISCUSION

Un aspecto novedoso de estos estudios es la demostración de que la velocidad de síntesis del rRNA no está simplemente relacionada o controlada por los niveles de RNA polimerasa I. Que la cantidad de polimerasa I no es el componente limitante en la síntesis del rRNA es particularmente obvio de la observación que los niveles de actividad soluble de esta enzima no se modifican luego de la inhibición total de la síntesis de proteínas, privación de amino ácidos o por la incubación de las células con toyocamicina, condiciones éstas que conducen a una rápida disminución en la actividad de esta enzima en los núcleos aislados. Nuestros resultados están en desacuerdo con los de Yu y Feigelson (1972) quienes encontraron, luego de la administración de cicloheximida a ratas, una rápida disminución en la actividad de la RNA polimerasa I en el nucleolo aislado de hígado, medida con un templado exógeno y cuando la transcripción endógena era bloqueada por actinomicina. Estos autores concluyeron de sus resultatados que la enzima misma ó algún componente polipeptídico del sistema de RNA polimerasa I tiene un alto recambio (vida media 1,3 horas) y que la velocidad de síntesis del rRNA dependería de la cantidad de enzima sintetizada. Sin embargo, Benecke y col (1973) no encontraron cambios en la cantidad de RNA polimerasa I hepática después de varias horas de la administración de cicloheximida a ratas. Nosotros encontramos que, si bien en células de tumor ascítico de Ehrlich hay una rápida disminución en la actividad de la RNA polimerasa I en los núcleos aislados luego de la inhibición de la síntesis proteica, esta disminución no es la consecuencia del alto recambio de la enzima. Resultados similares se han descripto más recientemente en levadura (Gross y Pogo, 1974) y en células HeLa (Chesterton y col, 1975). Por lo tanto, la cantidad de RNA polimerasa I no parece ser el factor limitante en el control de la transcripción del rRNA en diversos sistemas de eucariotes.

Los niveles de RNA polimerasa I soluble parecen estar aumentados en ciertas condiciones fisiológicas asociadas con un aumento en la ve

locidad de crecimiento y biosíntesis de proteínas, como es el caso de ciertas células o tejidos en respuesta a estímulos hormonales ó de crecimiento. Se han citado ejemplos en hígado de rata luego de la parcial hepatectomía (Yu, 1975), en oviducto de pollo después de 24 hs. de tratamiento con estradiol (Cox y col, 1973) o en linfocitos luego de cuatro días de exposición a fitohepatina (Jaehning y col, 1975). Tales alteraciones en los niveles de enzima soluble, sin embargo, pueden reflejar cambios adaptativos a largo plazo y no descartan la posible acción de otros factores regulatorios a plazos más cortos. En relación con esto último es de notar que cuando las células de tumor ascítico de Ehrlich son incubadas 3 horas en un medio con aminoácidos hay un aumento de 5-6 veces en la actividad de la RNA polimerasa I en los núcleos aislados con respecto a la actividad en núcleos aislados de células no incubadas. Sin embargo, hay sólo un aumento de 1,5 veces en la actividad soluble de esta enzima, sugiriendo que en adición a nueva síntesis de enzima hay estimulación de la actividad (datos no mostrados). Nuestros resultados sugieren que los cambios rápidos en la transcripción del rRNA por acción de distintos agentes presumiblemente involucran una modulación en la actividad de moléculas de RNA polimerasa preexistentes. Esta modulación podría ser la consecuencia de la síntesis y degradación de un factor activador proteico que regularía la actividad de la enzima cuando ésta transcribe específicamente los genes ribosomales. Otra posibilidad sería que esta modulación sea el resultado de la modificación de alguna subunidad de la enzima, por ejemplo por fosforilación. En este sentido es importante mencionar el reciente hallazgo de que ciertas subunidades de la RNA polimerasa I de levadura son fosforiladas in vivo (Bell y col, 1976).

La posibilidad de una modulación de la actividad por modificación de las subunidades de la enzima es atractiva. La actividad de muchas enzimas es controlada de esta manera (Rubin y Rosen, 1975). La fosforilación de las subunidades B y B' de la RNA polimerasa de Escherichia coli durante la infección por fagos T7 se ha implicado en el con

trol de la transcripción temprana del DNA T7 (Zilling y col, 1975). Sin embargo, modificaciones regulatorias similares no se han descrito, hasta el momento, en las RNA polimerasas de eucariotes.

La demostración de que la polimerasa I obtenida de células tratadas con agentes que conducen a una rápida disminución en la transcripción del rRNA exhibe una conducta cromatográfica diferente a la enzima aislada de células que transcriben activamente, sugiere que la modulación de la actividad podría ser la consecuencia de algún tipo de modificación en la enzima. Sólo una comparación de la estructura molecular de la RNA polimerasa I purificada de células tratadas con agentes que de diversa forma afectan la transcripción del rRNA, permitirá determinar si la enzima está modificada y cuál es la naturaleza, si existe, de dicha modificación. Un prerequisite para abordar este estudio es disponer de un método de purificación que posibilite la obtención de cantidades discretas de enzima altamente purificada.

Como la RNA polimerasa I de células de tumor ascítico de Ehrlich no había sido purificada se procedió a desarrollar el método de purificación total de esta enzima. Su descripción se detalla en la PARTE II.-

RESUMEN DE LA PARTE I

- 1.- Las R_{IIA} polimerasas DNA dependientes fueron solubilizadas y parcialmente purificadas de los núcleos aislados de células de tumor ascítico de Ehrlich, con una alta y reproducible recuperación de la actividad enzimática. Por cromatografía en DEAE-Sephadex se resolvieron dos formas de enzima designadas I y II. La polimerasa I es totalmente resistente a la α -amanitina mientras la polimerasa II es sensible a muy bajas concentraciones de la droga. Además, las enzimas I y II fueron distinguidas por otros criterios incluyendo preferencias de templado, fuerza iónica óptima, requerimientos de cationes divalentes y termoestabilidad. Con respecto a estas propiedades, las polimerasas I y II de células de tumor ascítico de Ehrlich son similares a las clases I y II de R_{IIA} polimerasa definidas en otros sistemas de eucariotes (Blatti y col, 1970; Jacob, 1973; Chambon y col, 1974).
- 2.- El método de purificación se aplicó al aislamiento de las R_{IIA} polimerasas de células incubadas con y sin amino ácidos, con inhibidores de la síntesis de proteínas (pactamicina) y con ciertos análogos de la adenosina como la toyocamicina. Si bien se observó una rápida disminución en la actividad de la R_{IIA} polimerasa I en los núcleos aislados luego de transferir las células a un medio sin amino ácidos o de adicionarles pactamicina ó toyocamicina, no se encontraron diferencias en los niveles de actividad soluble de la enzima extraída de estos núcleos y de los correspondientes núcleos control. Estos resultados indicaron que la cantidad de enzima no es el componente limitante en la transcripción del rRNA.
Por otra parte, la polimerasa I obtenida de núcleos con actividad de transcripción disminuída exhibía una conducta cromatográfica

diferente a la de la enzima obtenida de núcleos activados. Este hecho sugirió que la capacidad de la RNA polimerasa I para transcribir los genes ribosomales estaría disminuída como consecuencia de una modificación en la enzima. La polimerasa alterada, sin embargo, no podría revelar ninguna diferencia en la actividad cuando utiliza un DNA inespecífico.

P A R T E II

INTRODUCCION

La RNA polimerasa II ha sido purificada hasta homogeneidad en numerosos sistemas de eucariotes (Chambon, 1974; Chambon, 1975). Sin embargo, la comparativamente mayor labilidad de la RNA polimerasa I ha determinado que la purificación total de esta enzima se haya logrado, hasta el momento, solamente en timo de ternero (Gissinger y Chambon, 1972), mieloma de ratón (Schwartz y Roeder, 1974), hígado de rata (Coupar y Chesterton, 1975) y en ciertos eucariotes inferiores incluyendo levadura (Buhler y col, 1974; Valenzuela y col, 1976), Physarum polycephalum (Gornicki y col, 1974) y Mucor rouxi (Young y Whiteley, 1975). En estos sistemas la actividad específica de la RNA polimerasa I altamente purificada expresada en pmoles de UMP incorporados/mg de proteína en 10 min, varía de 200.000 a 400.000, mientras la recuperación final de la actividad enzimática en procedimiento de purificación total varía entre 2 y 15%. En base a estos datos, si se tiene en cuenta que la actividad de la polimerasa I en los extractos nucleares de células de tumor ascítico de Ehrlich, expresada en picomoles de UMP incorporados en 10 min por gramo de células, es de 2000 a 4000 y suponiendo una recuperación final de un 10 % se estimó que se requerirían 50 a 100 g de células para la obtención de 50 a 100 μ g de enzima altamente purificada.

La gran inestabilidad de la RNA polimerasa I resultó una de las mayores dificultades que se presentaron en el desarrollo del procedimiento de purificación. A diferencia de lo que ocurre con la purificación de otras enzimas donde es posible estudiar las diferentes etapas del proceso a partir de una reserva de enzima purificada hasta la etapa anterior, con la polimerasa I se debió estudiar cada nueva etapa sin interrupción a partir de los núcleos o células con-

geladas. Por otra parte, hubo que tener en cuenta la ya mencionada tendencia de esta enzima a interactuar con otras proteínas cromosómicas y la baja concentración relativa de enzima con respecto a la proteína celular total. La obtención de una preparación de enzima altamente purificada requirió, entonces, además de la eficiente extracción de la misma de la matriz cromosomal, la aplicación de numerosas etapas de purificación y la estabilización de la actividad enzimática a lo largo de todo el proceso. Por este motivo desarrollamos dos métodos de purificación alternativos partiendo de la cantidad mínima de células que posibilitara la aplicación de las sucesivas etapas. En la primera Sección se describen y comparan los resultados de la aplicación de estos dos métodos de purificación. Este estudio previo sentó las bases para el desarrollo del método final de purificación de la RNA polimerasa I, que se describe en la segunda Sección.

ESTUDIOS PRELIMINARES AL DESARROLLO DE UN METODO DE PURIFICACION DE LA RNA POLIMERASA I DE CELULAS DE TUMOR ASCITICO DE EHRlich

Materiales y Métodos

A - Reactivos

La QAE-Sephadex A-25, CM-Sephadex A-25, Sephadex G-200 y Sepharose 6B se obtuvieron de Pharmacia. La acrilamida, bisacrilamida y el TEMED de Eastman, el Coomassie Brilliant blue de Sigma Chemical Co. El origen de los restantes reactivos se indica en la Sección "Materiales y Métodos" de la PARTE I.

B - Métodos

1.- Células

La obtención de las células de tumor ascítico de Ehrlich y purificación de los núcleos se realizó como se describe en la Sección "Materiales y Métodos" de la PARTE I. Sin embargo, debido a la elevada cantidad de células requeridas para la purificación total de la RNA polimerasa I, éstas fueron congeladas antes de ser sometidas a los procedimientos usuales de fraccionamiento celular. Para ello, las células extraídas de la cavidad peritoneal de ratones y lavadas como se indicó previamente (PARTE I, "Materiales y Métodos"), se resuspendieron en un medio con amino ácidos conteniendo 20 % de glicerol y se congelaron rápidamente a -80°C . Las células así congeladas mantienen su viabilidad por lo menos durante 3 meses.

2.- Soluciones

A menos que se especifique otra cosa, la composición de los Buffers A, B y C es la misma que se indicó previamente (PARTE I, "Materiales y Métodos").

3.- Tratamiento de las resinas de intercambio iónico

La DEAE-Sephadex A-25 y Fosfocelulosa P-11 fueron tratadas como se describió en "Materiales y Métodos" de la PARTE I y equilibradas antes de su uso con 5 volúmenes del buffer que se indica. Otros intercambiadores iónicos utilizados, como QAE-Sephadex A-25 y CM-Sephadex, fueron sometidos respectivamente a los mismos tratamientos indicados para la DEAE-Sephadex A-25 y Fosfocelulosa P-11.

4.- Determinación de la actividad de RNA polimerasa

Las determinaciones de la actividad de RNA polimerasa se realizaron en un volumen final de 50 μ l como se indica en la Sección "Materiales y Métodos" de la PARTE I, pero utilizando DHA nativo como templado. La concentración de sulfato de amonio en la mezcla de reacción variaba de 0,03 M a 0,06 M dependiendo del experimento. Las reacciones fueron iniciadas por la adición de 10 μ l de enzima. Sin embargo, en las fracciones de enzima altamente concentradas, ya sea por precipitación con sulfato de amonio o por cromatografía en Fosfocelulosa, se utilizaron 3 μ l de enzima que fueron diluidos a 10 μ l de volumen final con el buffer apropiado. Después de un período de incubación de 10 min a 37°C, las reacciones fueron terminadas y la incorporación de [3 H] UMP en RNA fue medida como se describió previamente ("Materiales y Métodos", PARTE I). Esta mezcla de reacción contenía cantidades limitantes de UTP (0,01 mM) y fue utilizada en los ensayos de rutina. Sin embargo, cuando se midieron las actividades específicas de las diferentes fracciones la concentración de UTP se elevó a un nivel saturante de 0,10 mM (ver PARTE I). Una unidad de enzima representa la incorporación de 1 nmol de UMP en RNA en 10 min a 37°C cuando la concentración de UTP en la mezcla de reacción no era limitante. La actividad específica se expresa en unidades por mg de proteína.

5.- Determinación de proteínas

La concentración de proteínas fue determinada por el método de Hirs (1967). Antes de ser analizadas, las muestras fueron dializadas extensivamente contra Clila 50 mM y 2-mercaptoetanol 15 mM. Sero albúmina bovina cristalina fué utilizada como standard. Utilizando este procedimiento se detectan hasta 2 µg de proteína, siendo su sensibilidad mayor que la del método de Lowry (1951).

6.- Electroforesis en geles de poliacrilamida

Alícuotas de las fracciones de RNA polimerasa I purificada de acuerdo a los procedimientos que se indican en Resultados, fueron analizadas por electroforesis en geles con 5 % de acrilamida, a menos que se indique otra cosa, y en condiciones no denaturalizantes de acuerdo al procedimiento descrito por Maizel (1969). Cuando se indica, las fracciones de enzima fueron previamente concentradas por dialisis contra polietilenglicol durante 4-5 horas antes de ser analizadas electroforéticamente. Las electroforesis se realizaron a 23°C y 2,5 ma/gel (voltaje aprox. 270 volts) durante 5-6 horas. Los geles, previa fijación con tricloroacético (TCA) 12,5% w/v, fueron teñidos a temperatura ambiente con 0,05% de Coomassie Brilliant Blue R en TCA 12,5 % durante 14-16 horas y desteñidos con ácido acético 7%. Este método de tinción permite la detección de menos de 1 µg de proteína (Franze-Fernández y col, 1970).

7.- Purificación de la RNA polimerasa I: descripción de dos métodos alternativos

Todas las etapas se realizaron a 0-4°C. En ambos métodos las RNA polimerasas se solubilizaron de los núcleos de 28-30 g de células, y la Fracción F2 se obtuvo por los procedimientos descritos en la Sección "Materiales y Métodos" de la PARTE I.

a) Método A

Primera etapa: Cromatografía en DEAE-Sephadex

La Fracción F2 obtenida de 30 g de células se diluyó con Buffer A modificado ya que contenía 10% de glicerol, hasta que la concentración de sulfato de amonio fue de 0,05 M y luego se aplicó a una columna

de DEAE-Sephadex A-25 (4,4 x 10 cm), previamente equilibrada con Buffer A conteniendo 10% de glicerol y 0,05 M de sulfato de amonio. La columna fué lavada con 100 ml del mismo buffer y eluída con un gradiente lineal de 0,05 M a 0,4 M de sulfato de amonio en Buffer A con 10 % de glicerol (Volumen total del gradiente= 500 ml). El flujo aplicado a la columna fue de 180 ml/h y se colectaron fracciones de 18 ml. Las fracciones correspondientes al pico de actividad de la RNA polimerasa I se reunieron (Fracción FA3) y se cromatografiaron inmediatamente en Fosfocelulosa.

Segunda etapa: Primera Cromatografía en Fosfocelulosa

La Fracción FA3, con una conductividad equivalente a 0,075 M de sulfato de amonio, fue aplicada a una columna de Fosfocelulosa (1,7x5cm), previamente equilibrada con Buffer B conteniendo 0,07M de sulfato de amonio, y eluída con 5 volúmenes de columna de un gradiente lineal de 0,07M a 0,6 M de sulfato de amonio en Buffer B. El flujo aplicado a la columna fue de 6 ml/h y se colectaron fracciones de 1,2 ml. Las fracciones con actividad enzimática se reunieron y precipitaron por el agregado de 0,42 g/ml de sulfato de amonio. El precipitado se colectó por centrifugación durante 1 hora a 30.000 rpm en el rotor 30 de la ultracentrífuga Spinco L y se diluyó en 3,8 ml de Buffer B conteniendo 2mM HgCl_2 (Fracción FA4).

Tercera etapa: Cromatografía en QAE-Sephadex

La Fracción FA4 se diluyó con Buffer A hasta una concentración de sulfato de amonio de 0,075 M y se adsorbió a una columna de QAE-Sephadex A-25 (0,85 x 8 cm) previamente equilibrada con Buffer A conteniendo 0,07 M sulfato de amonio. La actividad de RNA polimerasa I se eluyó a 5 ml/h con un gradiente lineal de 0,07M a 0,4M de sulfato de amonio en Buffer B (Vol.Total: 24 ml) y se colectaron fracciones de 0,6 ml. Las fracciones con actividad enzimática se reunieron (Fracción FA5) y se utilizaron inmediatamente en la próxima etapa.

Cuarta etapa: Segunda Cromatografía en Fosfocelulosa

La Fracción FA5 se diluyó con Buffer B hasta una conductividad equivalente a 0,075 M de sulfato de amonio y se aplicó a una columna de Fosfocelulosa P-11 (0,9 x 3 cm) previamente equilibrada con Buffer B conteniendo 0,07 M sulfato de amonio. La actividad enzimática se eluyó a 4,5 ml/h aplicando un gradiente lineal de 0,07 a 0,5 M de sulfato de amonio en Buffer B (Vol. total: 12 ml) y se colectaron fracciones de 0,3 ml. En esta última etapa las fracciones correspondientes al pico de actividad se reunieron separadamente en 3 fracciones, designadas FA6, FA7 y FA8, tal como se describirá posteriormente en la Figura 22.

b) Método B

Primera etapa: Cromatografía en DEAE-Sephadex

La Fracción F2 obtenida de 20 g de células fue cromatografiada en una columna de DEAE-Sephadex A-25 en idénticas condiciones a las descritas en el Método A, salvo que el buffer de elución contenía la concentración habitual de glicerol (30%). En esta etapa las fracciones correspondientes al pico de actividad de la RNA polimerasa I se reunieron (Fracción FB3) y la purificación se continuó inmediatamente.

Segunda etapa: Primera Cromatografía en QAE-Sephadex

La Fracción FB3 con una conductividad equivalente a 0,075 M de sulfato de amonio se adsorbió a una columna de QAE-Sephadex A-25 (1,5x22cm) previamente equilibrada con Buffer A 0,07M sulfato de amonio. La resina fue lavada con un volumen de columna del buffer de equilibración y la actividad de RNA polimerasa I fué eluída con un gradiente lineal de 0,07 M a 0,3M de sulfato de amonio en Buffer A. El flujo aplicado a la columna fue de 20 ml/h y se colectaron fracciones de 4,2 ml. Las fracciones con actividad enzimática se reunieron (Fracción FB4) y se congelaron a -80°C durante 12 horas.

Tercera etapa: Segunda Cromatografía en QAE-Sephadex

La Fracción FB4 fué diluída con Buffer A hasta que la concentración de sulfato de amonio fué de 0,075M y aplicada a una columna de QAE-Sephadex A-25 (2,4x4 cm) previamente equilibrada con Buffer A conteniendo

0,07 M de sulfato de amonio. La columna fué lavada con dos vol. de columna del mismo buffer. La actividad de RNA polimerasa se eluyó con Buffer A conteniendo 0,2M sulfato de amonio. A esta concentración salina la enzima eluye en un volumen de 15 ml. El flujo aplicado a la columna fue de 40 ml/h y se colectaron fracciones de 3,75 ml. Las fracciones con actividad enzimática se reunieron y toda la actividad se precipitó con sulfato de amonio (0,4 g/ml). El precipitado se colectó por centrifugación durante 1 hora a 30.000 rpm en el rotor 30 de la ultracentrífuga Spinco L y se resuspendió en 1,5 ml de Buffer A (Fracción FB5).

Cuarta etapa: Cromatografía en Sepharose 6B

La Fracción FB5 se aplicó directamente a una columna de Sepharose 6B (1x37 cm) equilibrada con Buffer A conteniendo 0,2 M sulfato de amonio. La columna fué eluída con el mismo buffer a 5 ml/h y se colectaron fracciones de 0,85 ml. Las fracciones con actividad de RNA polimerasa se reunieron (Fracción FB6) y se congelaron a - 30°C durante 12 horas.

Quinta etapa: Tercera Cromatografía en QAE-Sephadex

La Fracción FB6 se diluyó hasta una conductividad equivalente de 0,07 M de sulfato de amonio y se adsorbió a una columna de QAE-Sephadex A-25 (0,9x6,3 cm), previamente equilibrada con Buffer A conteniendo 0,07 M sulfato de amonio. La actividad enzimática se eluyó a 6 ml/h con Buffer A conteniendo 0,2 M sulfato de amonio y se colectaron fracciones de 0,4 ml. En esta última etapa las fracciones correspondientes al pico de actividad se reunieron separadamente en dos fracciones, designadas FB7 y FB8. La Fracción FB7 comprende las fracciones con mayor actividad enzimática, la FB8 aquellas con menor actividad de RNA polimerasa (ver Figura 25).

RESULTADOS

1 - Estudio de las distintas etapas del procedimiento de Purificación: Consideraciones Preliminares

Para la selección de las distintas etapas del proceso de purificación se tuvo en cuenta la característica labilidad de la RNA polimerasa I; se trató de compatibilizar en cada etapa una buena purificación con la preservación de la actividad enzimática. Aprovechando el elevado peso molecular de las RNA polimerasas (500.000 a 600.000 daltons) (Chambon, 1974) en relación a otras proteínas celulares, se ensayó la aplicación de etapas tales como sedimentación en gradientes de glicerol y filtración por geles en Sephadex G-200 y Sepharose 6B.

Por otra parte, además de la cromatografía en DEAE-Sephadex, ya descrita en la Sección "Métodos" de la PARTE I, se intentó incluir otras resinas de intercambio iónico como QAE-Sephadex, CM-Sephadex y Fosfocelulosa, ésta última en diferentes condiciones a las que se indicaron previamente (ver "Métodos", PARTE I). La eficacia relativa de cada etapa fué examinada en forma preliminar, aplicándola directamente a los extractos nucleares crudos o después de una etapa previa de purificación por DEAE-Sephadex. Un buen grado de purificación se logró mediante la aplicación de cromatografías en Fosfocelulosa, QAE-Sephadex y filtración por geles en Sepharose 6B. La recuperación de actividad en todos estos procedimientos fue alta (50-80 %) y reproducible. El empleo de Fosfocelulosa tenía la ventaja adicional de una elevada capacidad comparada con otras resinas de intercambio iónico y de eliminar ácidos nucleicos contaminantes. En cambio, tuvo que descartarse la aplicación de otras etapas, como sedimentación en gradientes de glicerol, cromatografía de exclusión en Sephadex G-200 y cromatografía de intercambio iónico en CM-Sephadex. En las dos primeras etapas se obtuvo una baja purificación de la enzima, tanto si se aplicaban a baja como a alta fuerza iónica. Por cromatografía en CM-Sephadex se obtuvo una baja recuperación de la actividad enzimática y los re-

sultados no fueron reproducibles (resultados no mostrados).

2 - Descripción de dos métodos de purificación alternativos de la RIIA polimerasa I

Con la finalidad de determinar cuántas y cuáles eran las etapas más adecuadas se desarrollaron dos métodos de purificación alternativos en los cuales se incluyeron diferentes procedimientos cromatográficos. Las preparaciones de enzima obtenidas por ambos métodos fueron concentradas y analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones no denaturalizantes. Esta técnica fue utilizada para detectar la presencia de impurezas y tener una idea del peso molecular de éstas. La comparación de los análisis electroforéticos de las preparaciones de enzima purificada por estos dos métodos permitió evaluar la eficacia de determinados procedimientos cromatográficos en la eliminación de ciertas proteínas contaminantes e hizo posible delinear el método de purificación definitivo de la RIIA polimerasa I.

A continuación se describen los resultados obtenidos al aplicar dos procedimientos de purificación diferentes (A y B) a la RIIA polimerasa I. La primera etapa, común en ambos consistió en una cromatografía en DEAE-Sephadex. Esta etapa como se indicó previamente (PARTE I) permite la separación de las polimerasas I y II.

a) Método de Purificación A

Un resumen del método de purificación A se indica en la Tabla VIII. La Figura 1 muestra los resultados obtenidos cuando la polimerasa I proveniente de la primera cromatografía en DEAE-Sephadex fue cromatografiada en Fosfocelulosa. En esta etapa el pico de RIIA polimerasa I es ligeramente heterogéneo (Figura 20). Sin embargo no se observa la clara resolución en las dos formas de esta enzima que se encontró cuando se cromatografiaron los extractos nucleares directamente en Fosfocelulosa (ver Figura 19, PARTE I). La tercera etapa cromatográfica fue la adsorción de la enzima a una columna de QAE-Sephadex y elución de la misma con un gradiente lineal de sulfato de amonio. Cierta heterogeneidad en

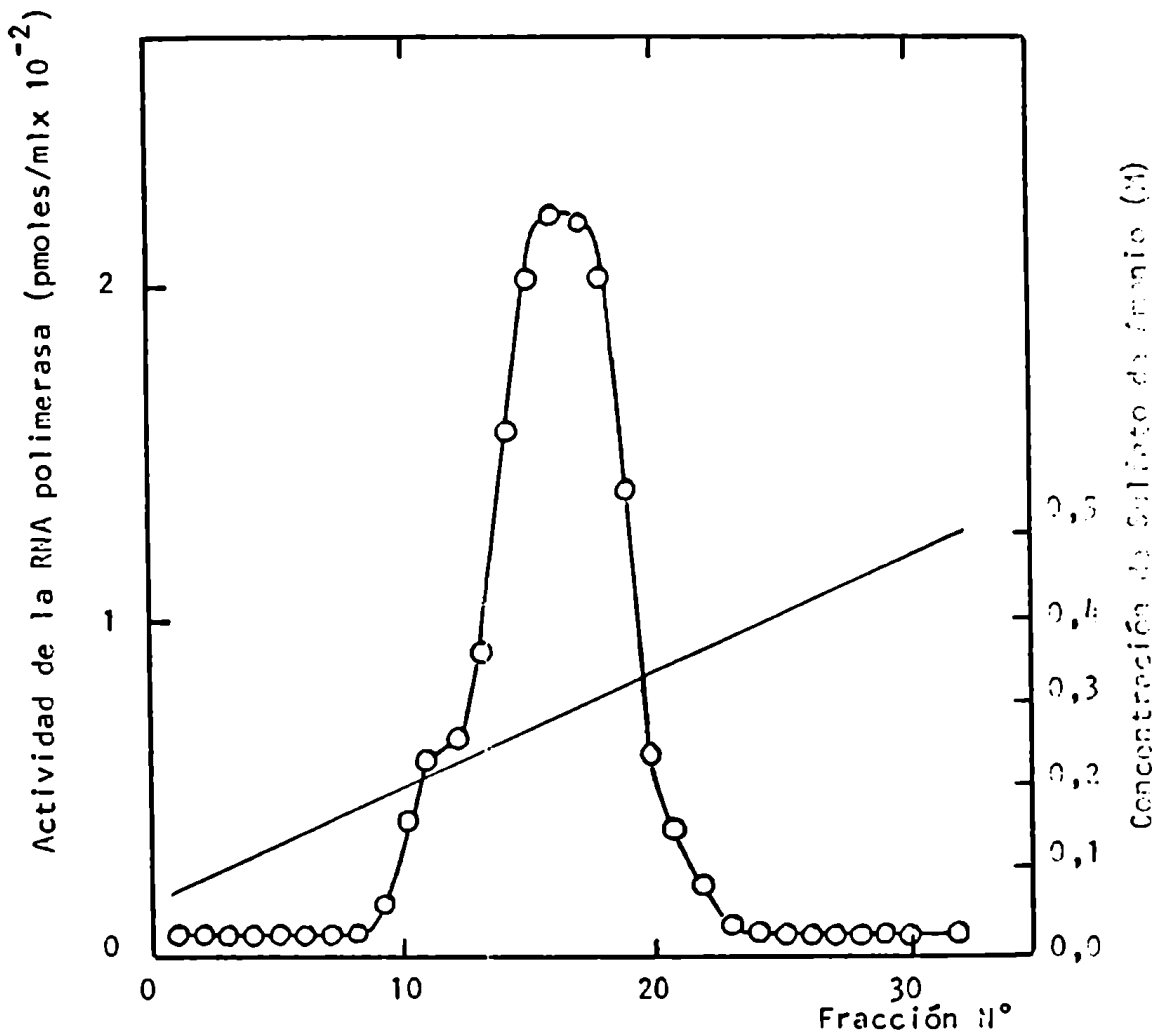


Figura 20: Primera Cromatografía en Fosfocelulosa (Método A)

La Fracción FA3 (100 ml; 57 mg de proteínas) obtenida de la cromatografía en DEAE-Sephadex, fué cromatografiada en una columna de Fosfocelulosa (1,7x5 cm) como se describe en "Métodos" (Método A). La actividad de RNA polimerasa I (○-○-○) se determinó en presencia de 0,01 mM de UTP y se expresa en Picomoles/ml de $[^3H]$ UMP incorporados en RNA en 10 min. La concentración de sulfato de amonio en la mezcla de reacción fue la resultante de la dilución de alícuotas de 10 μ l en el volumen final de 50 μ l de la mezcla de reacción. Las fracciones correspondientes al pico de actividad se reunieron y concentraron por precipitación con sulfato de amonio (Fracción FA4). La Fracción FA4 fué congelada a $-80^{\circ}C$ durante 12 horas, previa determinación de la actividad de RNA polimerasa y del contenido en proteínas. (—) Concentración de sulfato de amonio.

el pico de elución de la polimerasa I también se manifiesta en esta etapa (Figura 21). La enzima obtenida de la columna en QAE-Sephadex fue sometida a la etapa final de purificación consistente en una segunda Cromatografía en Fosfocelulosa. Como se ilustra en la Figura 22 toda la actividad enzimática eluye en un pico homogéneo. Esta variación del grado de heterogeneidad cromatográfica de la RIA polimerasa I según el estado de purificación de la enzima será discutida en detalle más adelante. En esta última etapa las primeras fracciones, las centrales y las últimas correspondientes al pico de actividad (Figura 22) fueron reunidas separadamente, concentradas y analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones no denaturalizantes según se describe en "Métodos". Las electroforesis se realizaron en geles de 5 y 10 % de acrilamida para resolver más claramente el peso molecular de las distintas bandas de proteína. Los análisis electroforéticos serán esquematizados y discutidos más adelante cuando se los compare con los obtenidos por el método B.

En la Tabla VIII se resumen los resultados obtenidos en las distintas etapas del método de purificación descrito previamente. Hay que destacar que como la primera cromatografía en DEAE-Sephadex requería el empleo de grandes volúmenes de Buffer A, que contiene 30% de glicerol y ante el elevado costo del mismo se decidió disminuir en esta etapa su concentración al 10 %. En neto contraste a los resultados previos, (ver PARTE I), esto determinó una marcada pérdida de la actividad enzimática tanto en la Fracción F2 luego de su dilución previa a la cromatografía (datos no mostrados), como en el procedimiento cromatográfico en sí. Estos resultados indicaron, que independientemente del estado de purificación de la enzima, el glicerol es necesario para protegerla de la inactivación y que la completa estabilización se logra a una concentración final de 30 % o más. Por otra parte, la recuperación de la actividad enzimática en las siguientes etapas de purificación es alta (50 a 70%), obteniéndose una recuperación final baja debido fundamentalmente a la pérdida inicial de la actividad en la primera etapa de cromatografía en DEAE-Sephadex.

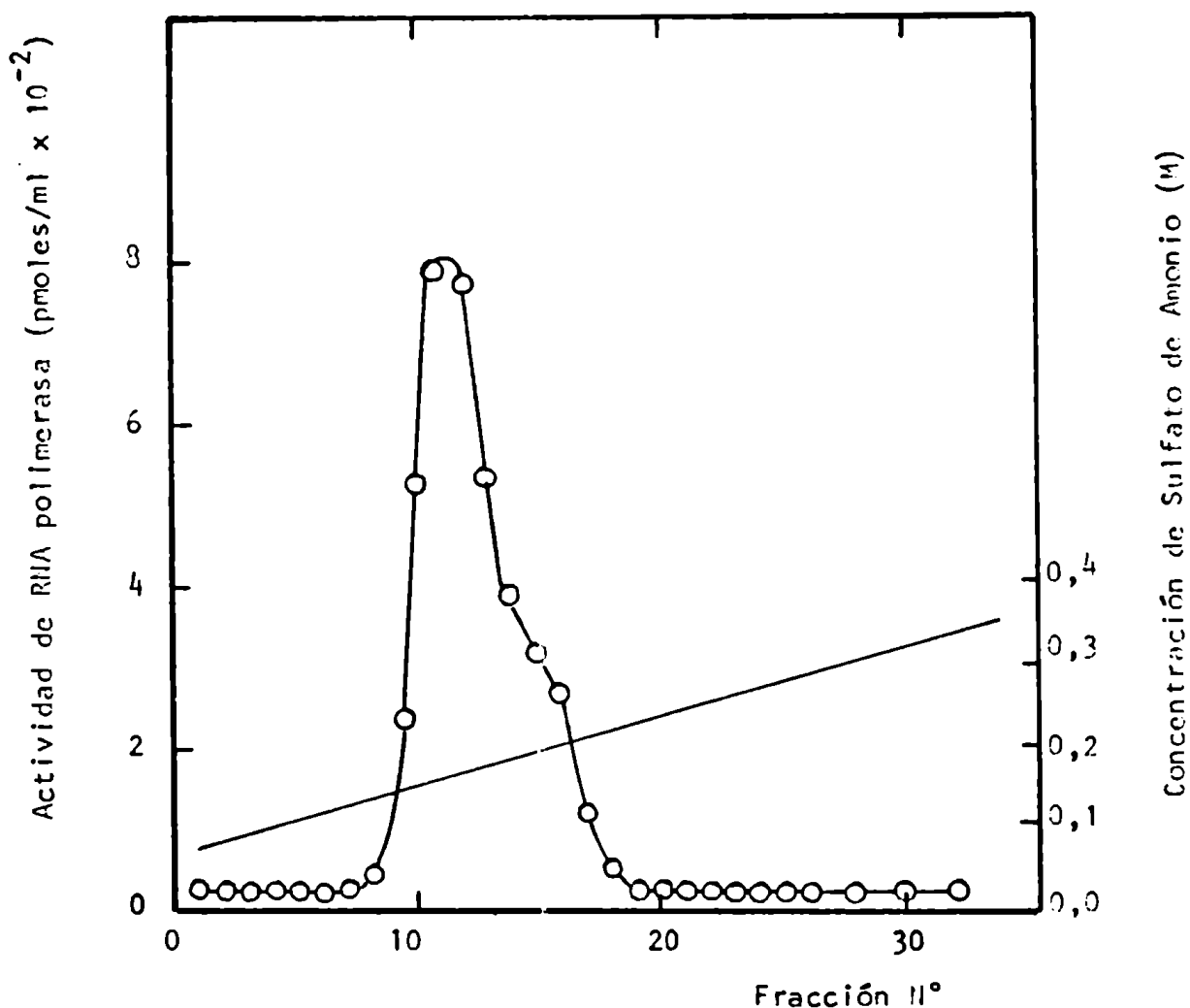


Figura 21: Cromatografía en QAE-Sephadex (Método A)

La Fracción FA4 (3,8 ml; 9,25 mg de proteína) obtenida de la Primera Cromatografía en Fosfocelulosa (Figura 20) fue cromatografiada en una columna de QAE-Sephadex (0,85 x 8 cm) como se indica en "Métodos" (Método A). La actividad de RIA polimerasa (○—○) se determinó como se describe en la Figura 20. Las fracciones con actividad enzimática se reunieron (Fracción FA5) y se utilizaron inmediatamente en la próxima etapa (Figura 22), previa determinación de la actividad de RIA polimerasa y del contenido en proteínas. (—) Concentración de sulfato de amonio.

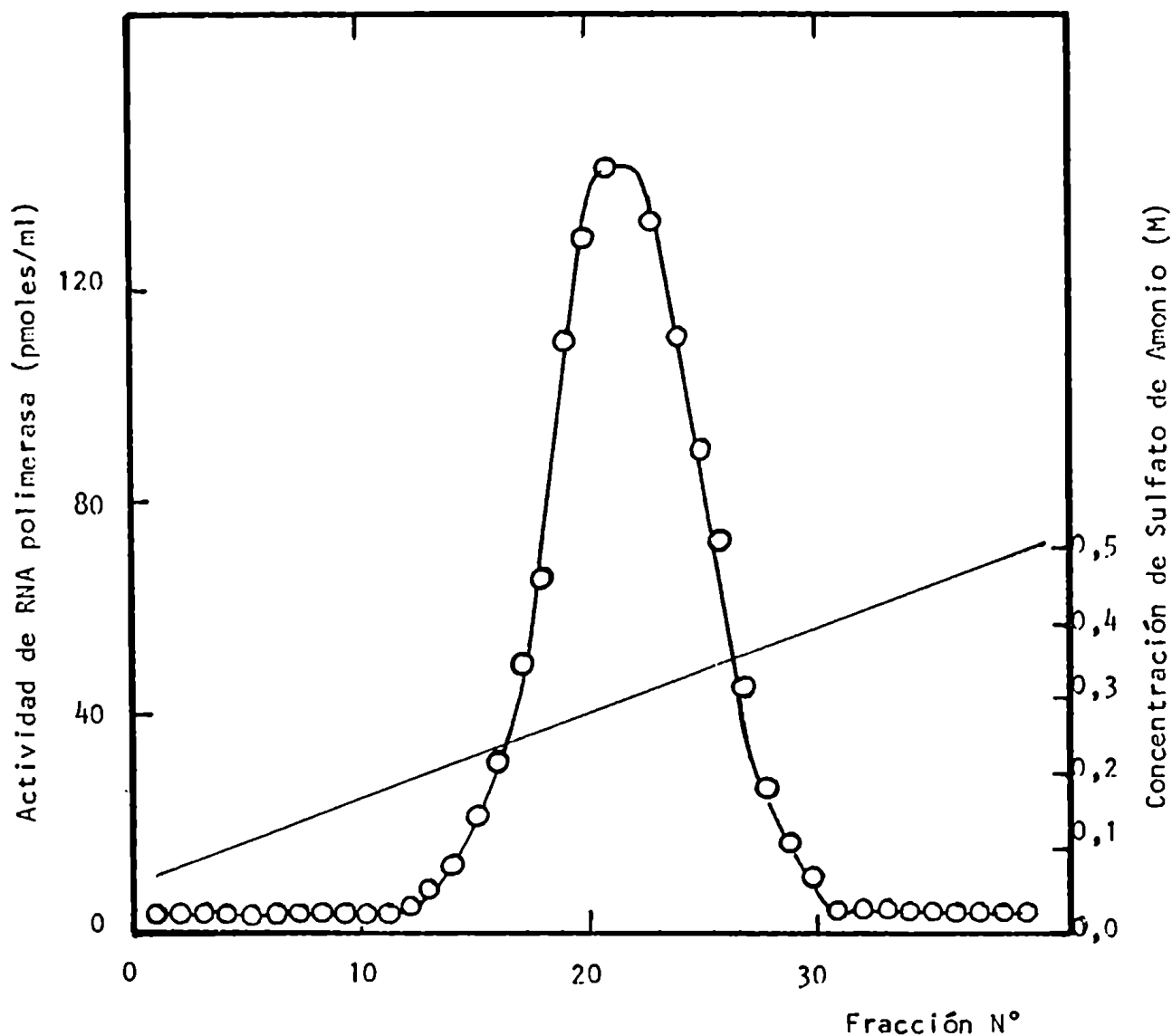


Figura 22: Segunda Cromatografía en Fosfocelulosa - (Método A)

La Fracción FA5 (6 ml; 1,4 mg de proteína) obtenida de la cromatografía en QAE-Sephadex (Figura 21) fue cromatografiada en una segunda columna de Fosfocelulosa (0,9 x 3 cm) según se detalla en "Métodos" (Método A). La actividad de RNA polimerasa (—○—) se determinó como se indica en la Figura 20. Las fracciones correspondientes al pico de actividad se reunieron separadamente en las siguientes fracciones: FA6 (1,5 ml) que comprende las fracciones 16 a 20; FA7 (3 ml), las fracciones 21 a 30 y FA8 (1,5 ml), las fracciones 31 a 35. (—) Concentración de sulfato de amonio.

TABLA VIII : Resumen del Método A de Purificación de la RNA polimerasa I de células de tumor ascítico de Ehrlich

Etapa de Purificación	Fracción	Vol. ml	Proteína mg	Actividad total unidades	Actividad específica unid/mg prot.	Recuperación %
Extracto Nuclear	F2	66	635	117	0,18	100
Cromatografía en DEAE-Sephadex	FA3	100	57	10	0,17	8
1ra. Cromatografía en Fosfocelulosa	FA4	3,8	9,25	7	0,76	6
Cromatografía en QAE-Sephadex	FA5	6	1,4	4	3,00	3,6
2da. Cromatografía en Fosfocelulosa	FA6	1,5	-	0,35	-	2,4
	FA7	3	-	2,30	-	
	FA8	1,5	-	0,18	-	

- Los datos resumen la purificación de la RNA polimerasa I extraída de 30 g de células de acuerdo al Método A, descrito en "Métodos". La actividad de RNA polimerasa fue determinada a concentraciones saturantes de UTP (0.10 mM UTP) según se indica en "Métodos". La concentración de sulfato de amonio en la mezcla de reacción varió de 30 a 60 mM dependiendo de la fracción de enzima ensayada. La actividad en la Fracción F2 fue determinada en presencia de 4 μ g/ml de α -amanitina. La actividad insensible a esta toxina corresponde a la RNA polimerasa I (ver PARTE I). El bajo contenido en proteínas de las fracciones FA6 a FA8 impidió su determinación. La definición de unidad de actividad se indica en "Métodos".

b) Método de Purificación B

La Fracción F2 fue cromatografiada en DEAE-Sephadex en idénticas condiciones a las indicadas en el Método A, salvo que el Buffer A utilizado para diluir la Fracción F2 y eluir la columna contenía la concentración habitual de 30% de glicerol. La RNA polimerasa I obtenida de esta primera cromatografía en DEAE-Sephadex se aplicó a columna de QAE-Sephadex y la enzima se eluyó con un gradiente lineal de sulfato de amonio. El perfil de elución de la polimerasa I en esta etapa fue similar al obtenido en la cromatografía en QAE-Sephadex del Método A (ver Figura 21). La fracción de enzima así obtenida fue luego concentrada y purificada mediante la adsorción a una pequeña columna de QAE-Sephadex y la elución con Buffer A conteniendo 0,2M sulfato de amonio (Figura 23). Las fracciones con actividad enzimática se reunieron, se concentraron por precipitación con sulfato de amonio y se aplicaron directamente a una columna de Sepharose 6B (Figura 24). La etapa final de este método fue la adsorción de la enzima obtenida de la cromatografía en Sepharose 6B a una tercer columna de QAE-Sephadex y la elución de la enzima, como antes, con Buffer A conteniendo 0,2M sulfato de amonio con el objeto de concentrar la preparación enzimática (Figura 25). En esta última etapa las fracciones del pico de actividad de la polimerasa I se reunieron separadamente en 2 fracciones (FB7 y FB8), que comprenden respectivamente las fracciones con mayor y menor actividad enzimática (Figura 25). Ambas fracciones fueron concentradas y analizadas en geles de poliacrilamida en condiciones no denaturalizantes según se describió en el Método A.

Un resumen del método de purificación descrito anteriormente se muestra en la Tabla IX. La recuperación de la actividad enzimática en cada una de las etapas fue en general del 60 - 70 %. La acentuada disminución de la actividad enzimática que se observa en la segunda cromatografía en QAE-Sephadex no es debida a una baja recuperación en la cromatografía en sí, sino a la pérdida de un 50% de la actividad como resultado de la dilución previa a ésta (resultados no mostrados). Como se indica en la Tabla IX, por este método de puri-

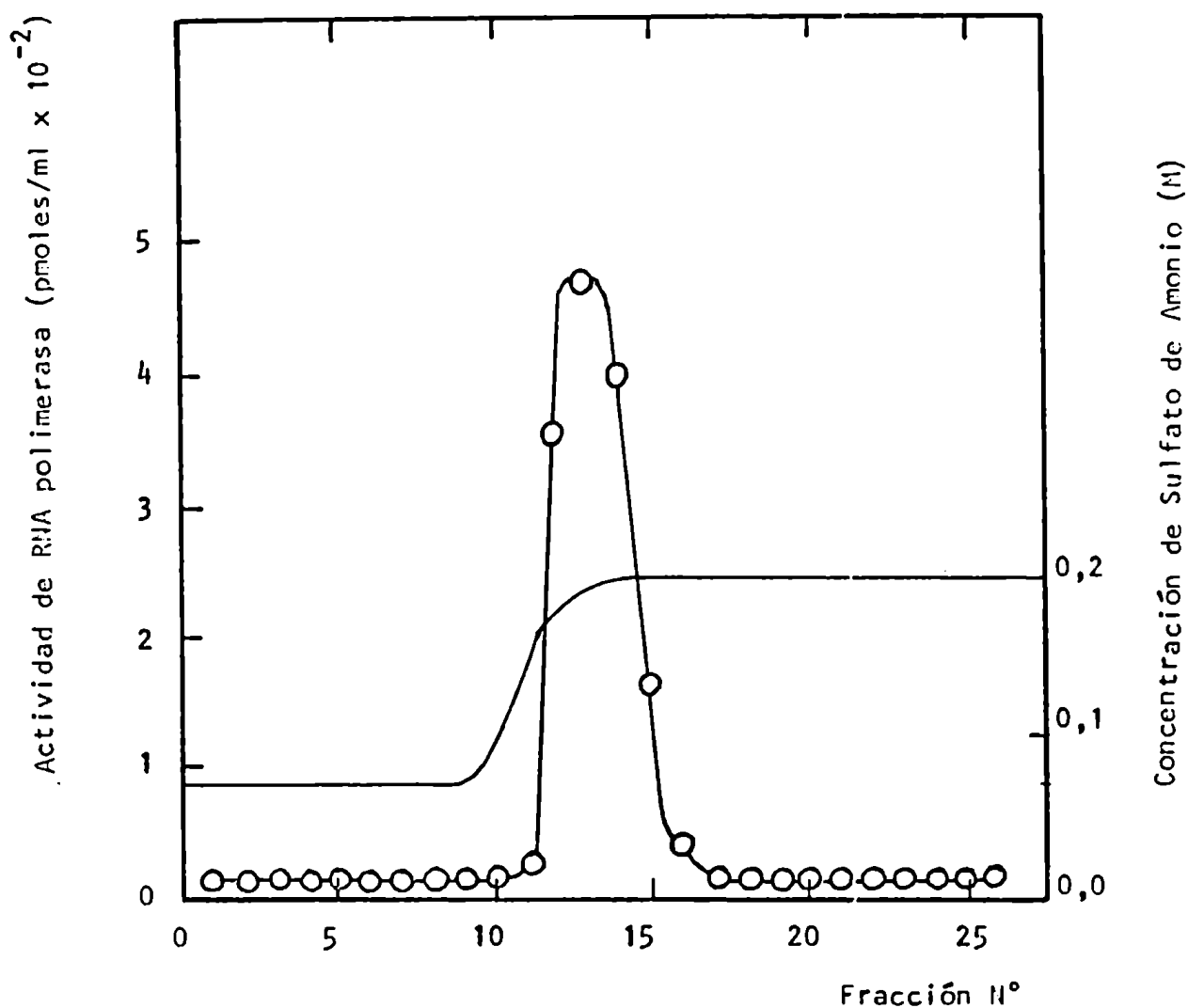


Figura 23: Segunda Cromatografía en QAE-Sephadex (Método B)

La Fracción FB4 (42ml, 3,85 mg de proteína) obtenida de la Primera Cromatografía en QAE-Sephadex, fue cromatografiada en una segunda columna de QAE-Sephadex (2,4 x 4 cm) según se detalla en el Método B descrito en "Métodos". La actividad de RHA polimerasa (○—○) se determinó como se indica en la Figura 20. Las fracciones correspondientes al pico de actividad se reunieron y se concentraron por precipitación con sulfato de amonio (Fracción FB5) y luego se determinó la actividad de RHA polimerasa y contenido en proteínas. (—) Concentración de sulfato de amonio.

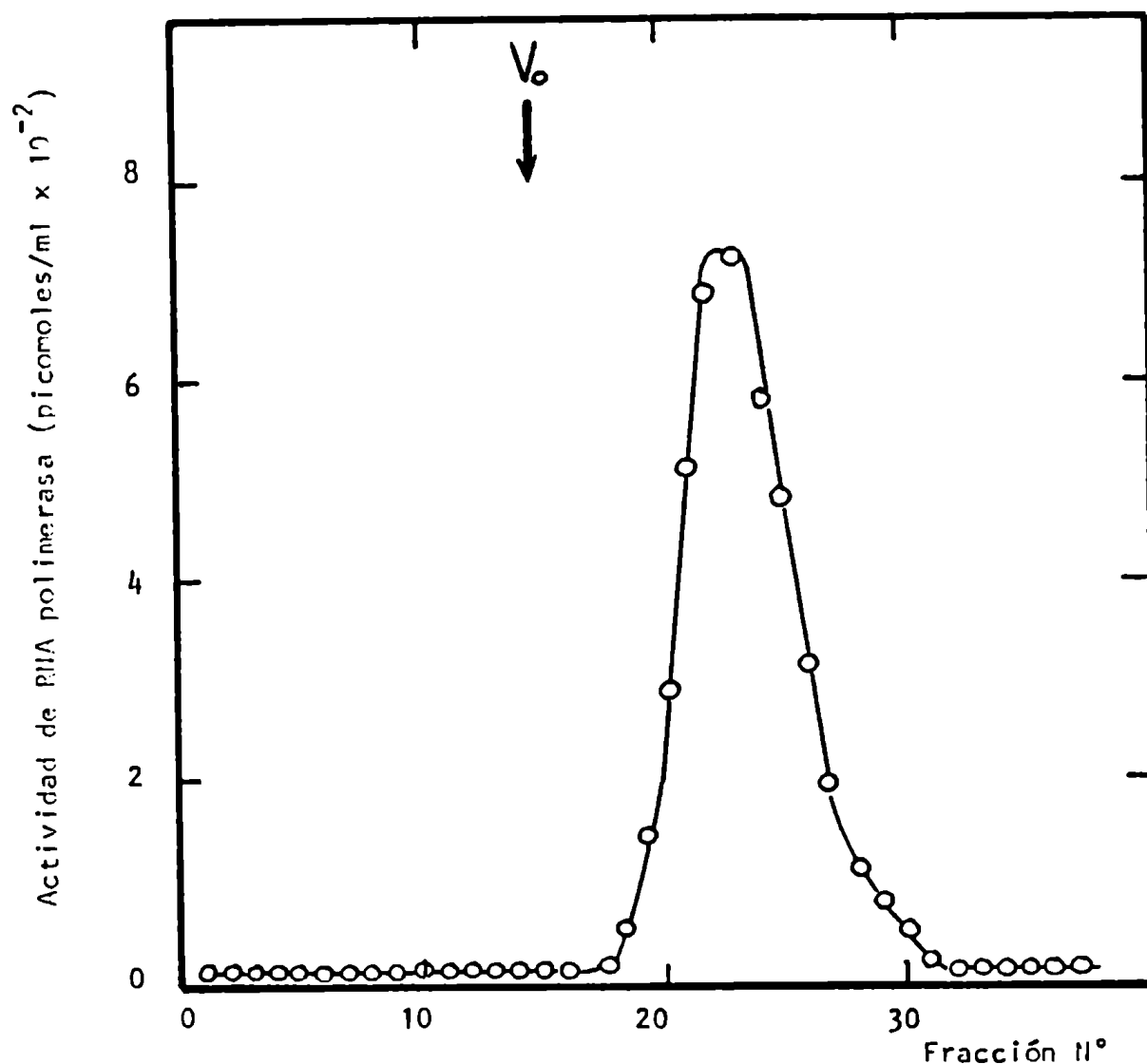


Figura 24: Cromatografía en Sepharose 6B (Método B)

La Fracción FB5 (1,5 ml; 1 mg de proteína) obtenida de la Segunda Cromatografía en QAE-Sephadex (Figura 23) fue aplicada a una columna de Sepharose 6B (1x37 cm) y eluida como se describe en "Métodos" (Método B). La actividad de RIA polimerasa (—○—○—) se determinó como se indica en la Figura 20. Las fracciones correspondientes al pico de actividad se reunieron (Fracción FB6) y se utilizaron inmediatamente en la próxima etapa de purificación, previa determinación de la actividad de RIA polimerasa y contenido de proteínas. La flecha indica la posición de elución del Azul Dextran 2000 (Pharmacia).

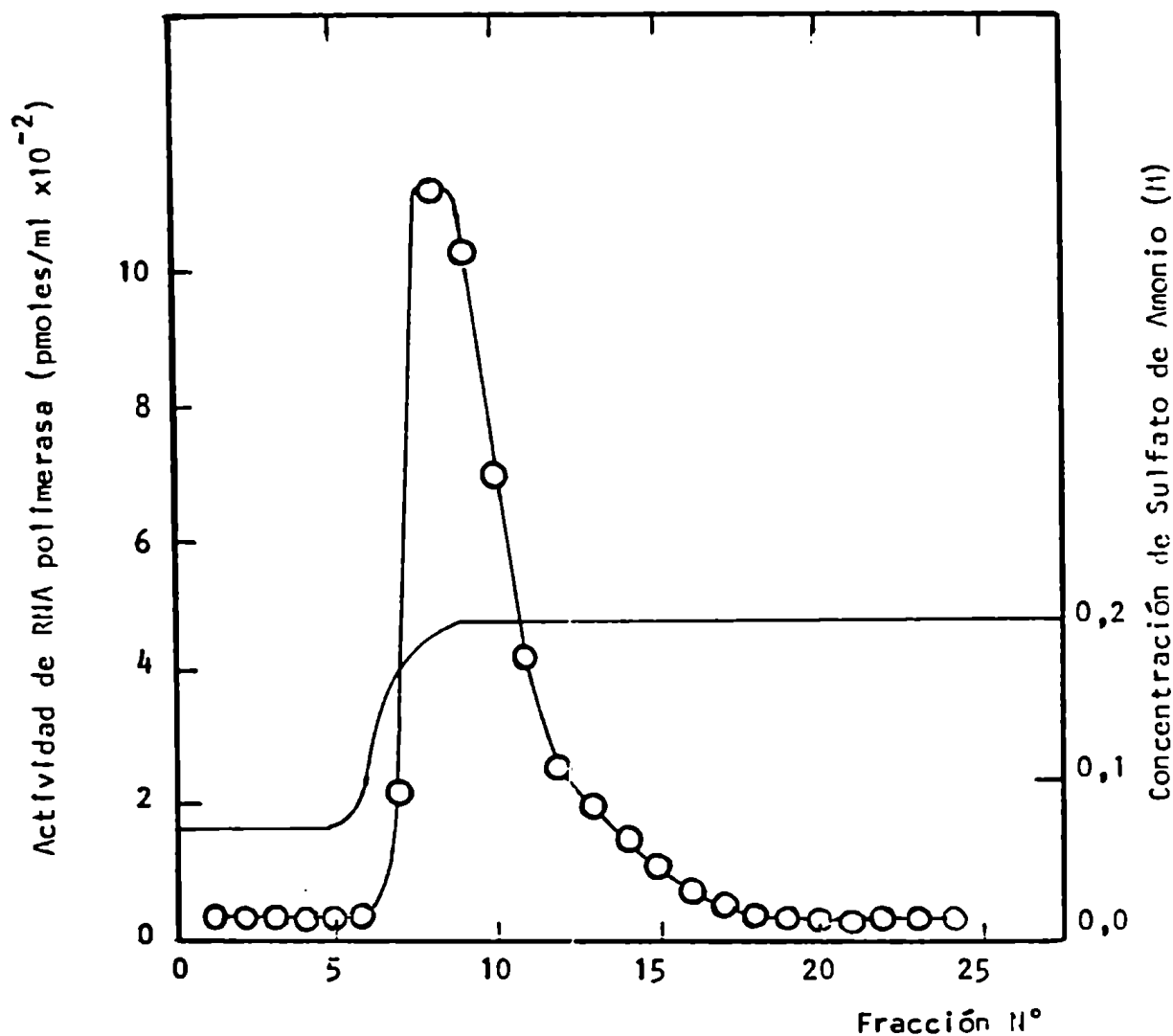


Figura 25: Tercera Cromatografía en QAE-Sephadex - (Método B)

La Fracción FB6 (7,5 ml; 0,55 ng de proteína) obtenida de la Cromatografía en Sepharose 6B (Figura 24) fue cromatografiada en una tercer columna en QAE-Sephadex (0,9 x 6,3 cm) como se describe en "Métodos" (Método B). La actividad de RNA polimerasa (—○—) se determinó como se indica en la Figura 20. Las fracciones correspondientes al pico de actividad se reunieron separadamente en dos fracciones: la Fracción FB7 (1,6 ml) que comprende las fracciones 8 a 11 y la FB8 (2,4 ml), las fracciones 11-16 que se indican en esta figura. (—) Concentración de sulfato de amonio.

TABLA IX : Resumen del Método B de Purificación de la RNA polimerasa I de células de tumor ascítico de Ehrlich

Etapa de Purificación	Fracción	Vol. ml	Proteína mg	Actividad total unidades	Actividad específica unid/mg prot.	Recuperación %
Extracto Nuclear	F2	30	405	130	0,32	100
Cromatografía en DEAE-Sephadex	FB3	108	24,75	92	3,70	70
1ra. Cromatografía en QAE-Sephadex	FB4	42	3,85	74	19,20	57
2da. Cromatografía en QAE-Sephadex	FB5	1,5	1	28	28,15	22
Cromatografía en Sepharose 6B	FB6	7,5	0,55	21	37,80	16
3ra. Cromatografía en QAE-Sephadex	[FB7 FB8]	[1,6 2,4]	[- -]	[10 5]	[- -]	12

- Los datos resumen la purificación de la RNA polimerasa I extraída de 28 g de células de acuerdo al Método B que se describió en "Métodos". La actividad de RNA polimerasa se determinó como se indica en la Tabla VIII. El bajo contenido en proteínas de las fracciones FB7 y FB8 impidió su determinación. La definición de unidad de actividad se indica en "Métodos".

ficación se recupera aproximadamente el 12% de la actividad de RNA polimerasa I presente en los extractos nucleares.

- Conclusiones

En la Figura 26 se esquematizan los análisis electroforéticos de las fracciones de RNA polimerasa I purificada por los Métodos A y B. Los resultados indicaron:

1°- La presencia en ambos métodos de una banda de movilidad electroforética similar a la indicada para las RNA polimerasas purificadas de otras células animales (Kedinger y col, 1971; Coupar y Chesterton, 1975) y cuya intensidad de tinción relativa es mayor en las fracciones con mayor actividad enzimática. De estos resultados se concluyó tentativamente que dicha banda corresponde a la RNA polimerasa I. Como se indicará en el Capítulo 3, esto fué confirmado en estudios posteriores.

2°- Se comprobó la presencia de proteínas contaminantes de bajo peso molecular (< de 60.000 daltons) en el Método A y de alto peso molecular (> de 130.000 daltons) en el Método B. Por lo tanto, teniendo en cuenta los procedimientos cromatográficos empleados en cada uno de los Métodos de purificación (Tablas VIII y IX), se concluyó que la Fosfocelulosa, utilizada sólo en el Método A, es una buena etapa de purificación para eliminar proteínas contaminantes de alto peso molecular mientras la Sepharosa 6B, utilizada sólo en el Método B, lo es para eliminar impurezas de bajo peso molecular.

En base a estas consideraciones se decidió utilizar en el Método de purificación de la RNA polimerasa I, que se describirá en la Sección siguiente, una combinación de los procedimientos cromatográficos utilizados en los métodos A y B. Además, para la selección de las distintas etapas así como su secuencia se tuvieron en cuenta las siguientes observaciones derivadas de numerosos experimentos preliminares, tendientes a preservar la actividad de la RNA polimerasa I a lo largo

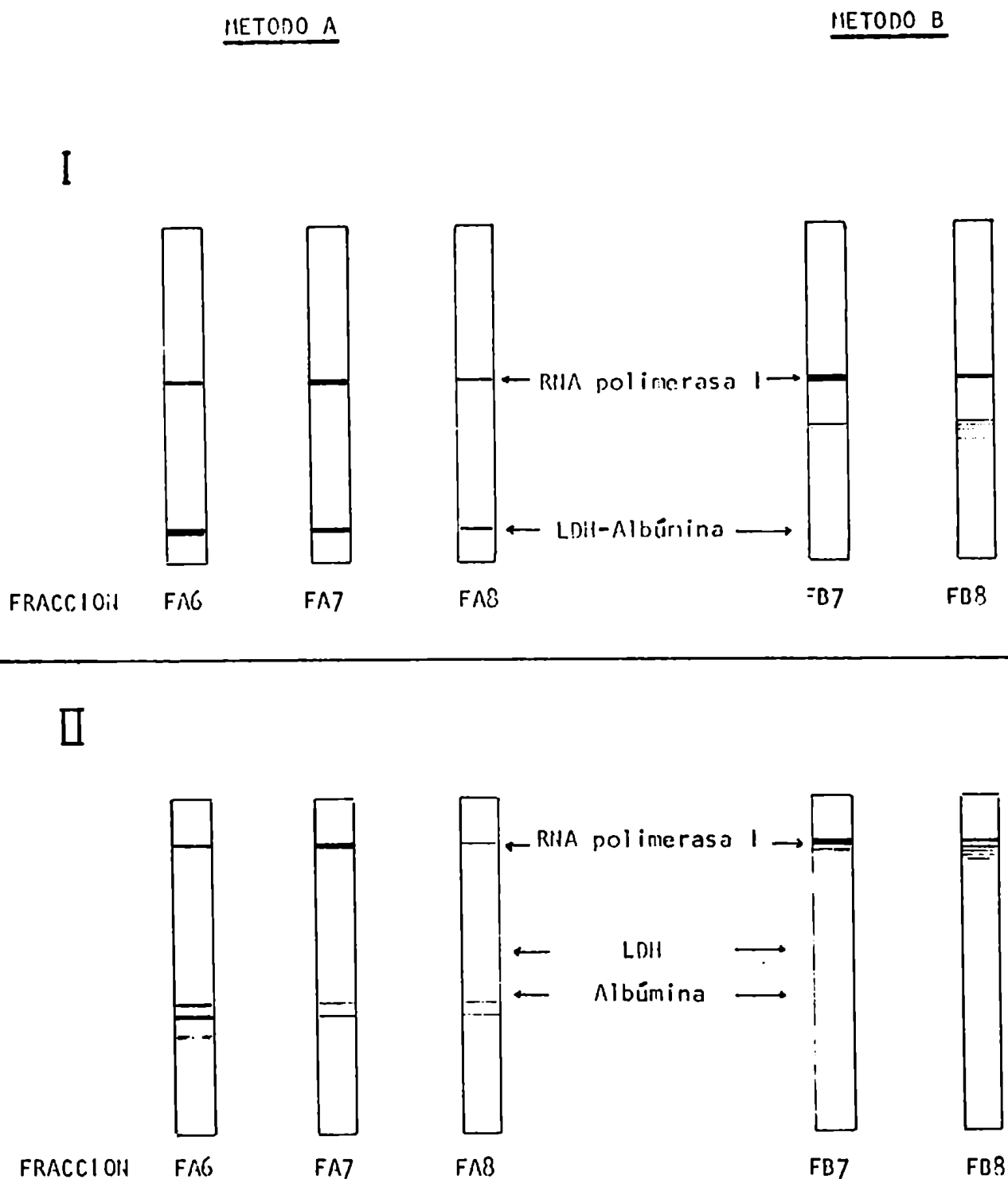


Figura 26: Electroforesis en Geles de Poliacrilamida en condiciones no denaturalizantes de la RNA polimerasa I purificada por los Métodos A y B. Alícuotas de las fracciones de la RNA polimerasa I purificada por el Método A [FA6 (0,12 unidades), FA7 (0,37 unidades) y FA8 (0,07 unidades)] y por el Método B [FB7 (0,45 unidades) y FB8 (0,23 unidades)], previamente concentradas por diálisis contra polietilenglicol, se analizaron por electroforesis en Geles de 5 % de acrilamida (PARTE I) y de 10 % de acrilamida (PARTE II), en condiciones no denaturalizantes, como se indica en "Métodos". En las figuras 22 y 25 se detalla la obtención de las Fracciones FA6 a FA8 y de las Fracciones FB7 y FB8 respectivamente. Las flechas indican la posición de migración de la RNA polimerasa I y de las proteínas marcadoras Láctico deshidrogenasa II (PM 133,000) y Sero albúmina bovina (PM 69,000) que fueron corridas en paralelo con las fracciones de enzima. La definición de unidad de enzima se indica en "Métodos".

de todo el proceso de purificación:

a) En todas las etapas de purificación estudiadas se observó que cuanto mayor es la concentración de la enzima mayor es la recuperación de la actividad enzimática. Las diluciones directas de las preparaciones de enzima para alcanzar la concentración salina adecuada para la fijación en las resinas de intercambio iónico resultaron en acentuadas pérdidas de la actividad enzimática, por ejemplo en la segunda cromatografía en QAE-Sephadex (Método B, Tabla IX). Por lo tanto se estudió la posibilidad de disminuir la concentración salina por diálisis. Sin embargo, la diálisis de fracciones muy impuras como la Fracción F2 con elevada concentración de proteínas, determina la asociación inespecífica e irreversible de la RHA polimerasa I a otras proteínas celulares, presumiblemente básicas, alterando su comportamiento cromatográfico. Por otra parte, la diálisis de fracciones en estado avanzado de purificación contra un buffer con la concentración requerida de glicerol (30% - 40%) para estabilizar la enzima, es un proceso sumamente lento que resulta en una pérdida del 60% de la actividad. Fue necesario entonces, descartar la diálisis como procedimiento para disminuir la concentración salina. Para diluir al mínimo las muestras de enzima a aplicar en las diversas columnas de resinas de intercambio iónico, se dispuso utilizar resinas con afinidad creciente para la RHA polimerasa I en las sucesivas etapas de purificación. Además, las diluciones de las preparaciones de enzima para alcanzar la concentración salina adecuada se realizaron en todos los casos en pequeñas alícuotas de modo que la enzima estuviera diluída el menor tiempo posible.

b) Cuando fue posible (concentración de proteínas mayor de 0,3 mg/ml), las fracciones con actividad enzimática eluídas de las columnas de cromatografía se precipitaron con sulfato de amonio y se resuspendieron en un volumen mínimo de Buffer A o B conteniendo 50 % de glicerol. De lo contrario (concentración de proteínas menor de 0,3 mg/ml) se concentraron fijándolas a una columna de Fosfocelulosa y la activi

dad de la RNA polimerasa I se eluyó en un volumen mínimo de Buffer B conteniendo altas concentraciones de sulfato de amonio. De este modo se logró además de concentrar las fracciones de enzima una parcial purificación de las mismas.

c) A partir de la segunda etapa cromatográfica las fracciones eluidas de las columnas de cromatografía se recogieron en tubos conteniendo glicerol de modo que la concentración final del mismo fuera de 50-60%.

PURIFICACION DE LA RNA POLIMERASA I DE CELULAS DE TUMOR ASCITICO DE EHRLICH

I - Materiales y Métodos

La obtención de las células de tumor ascítico de Ehrlich, purificación de los núcleos, las determinaciones de la actividad de RNA polimerasa, de proteínas y de la conductividad se realizaron como se indicó previamente ("Materiales y Métodos" PARTE II, 1ra. Sección). La composición de los Buffers se detalla en la Sección "Materiales y Métodos" de la PARTE I.

1) Procedimiento de purificación de la RNA polimerasa I

Primera etapa: Solubilización de las RNA polimerasas

La solubilización de las RNA polimerasas se realizó de acuerdo al procedimiento descrito en la Sección Materiales y Métodos de la PARTE I exceptuando las siguientes modificaciones. Los núcleos aislados de 50 g de células se suspendieron en 150 ml (volumen final) de Buffer C. La suspensión nuclear se llevó a 0,32 M sulfato de amonio por el agregado de una solución 4M de sulfato de amonio (pH 7.9). La solución viscosa resultante fué sonicada en volúmenes de 25 ml durante 60-70 s en las mismas condiciones que se indicaron previamente ("Métodos" PARTE I). Inmediatamente después se adicionaron 2 volúmenes de Buffer A conteniendo 20 % de glicerol y la solución se agitó durante 30 min (Fracción F1).

El precipitado de cromatina formado fue removido por centrifugación durante 120 min a 30.000 rpm en el rotor 30 de la ultracentrífuga Spinco L. El sobrenadante conteniendo toda la actividad enzimática fue llevado a casi saturación por la adición de 0,42 g/ml de sulfato de amonio. El precipitado se colectó por centrifugación a 30.000 rpm durante 70 min en el rotor 30 de la ultracentrífuga Spinco L y se resuspendió en 100 ml de Buffer A (Fracción F2). Esta fracción se congeló a -70°C durante 12 horas.

Segunda etapa: Primera Cromatografía en DEAE-Sephadex

La Fracción F2 (100 ml) correspondiente a 50 g de células fue diluida con Buffer A hasta una concentración final de sulfato de amonio de 0,05M y aplicada a una columna de DEAE-Sephadex A-25 (4,4 x 18 cm) previamente equilibrada con Buffer A conteniendo 0,05M de sulfato de amonio. La columna fue lavada con un volumen de columna de buffer de equilibración y eluida con un gradiente lineal de 0,05M a 0,40M de sulfato de amonio en Buffer A. El tamaño total del gradiente fue equivalente a 3 volúmenes de columna. Las fracciones correspondientes al pico de actividad de la RNA polimerasa I (insensible a 200 $\mu\text{g/ml}$ de α -amanitina) se reunieron y toda la actividad enzimática se precipitó por el agregado de 0,42 g/ml de sulfato de amonio. El precipitado se colectó por centrifugación a 30.000 rpm durante 90 min. en el rotor 30 de la ultracentrífuga Spinco L y se diluyó en 30 ml (vol. final) de Buffer B conteniendo 50 % de glicerol y 2 mM MgCl_2 . Esta fracción (F3) fue congelada durante 12 h. a -80°C , previa determinación de la actividad enzimática.

Tercera etapa: Primer Cromatografía en FosfoCelulosa

La Fracción F3 fue diluida en Buffer B hasta una conductividad equivalente a 0,075 M de sulfato de amonio y aplicada a una columna de FosfoCelulosa P-11 (2,4 x 12 cm), previamente equilibrada con Buffer B conteniendo 0,07M de sulfato de amonio. La columna fue lavada con un volumen del buffer de equilibración y la actividad de RNA polimerasa fue eluida con 5 volúmenes de columna de un gradiente lineal de 0,07 a 0,50M

de sulfato de amonio en Buffer B. Las fracciones conteniendo actividad de RIA polimerasa se reunieron y toda la actividad enzimática se precipitó con sulfato de amonio como en la etapa precedente. El precipitado fue resuspendido en Buffer B conteniendo 50 % de glicerol y 2mM $HgCl_2$ (Fracción F4) y congelado a $-20^{\circ}C$ durante 12 horas.

Cuarta etapa: Segunda Cromatografía en DEAE-Sephadex

La Fracción F4 (8 ml) obtenida de la etapa anterior se diluyó con Buffer A hasta una concentración de sulfato de amonio de 0,05M y se adsorbió a una columna de DEAE-Sephadex A-25 (1,6 x 10 cm) equilibrada con Buffer B conteniendo 0,05M de sulfato de amonio. La columna fue lavada con 1,5 volúmenes de columna del buffer de equilibración y eluida con 4 volúmenes de columna de un gradiente lineal de 0,05M a 0,35M de sulfato de amonio en Buffer B. El flujo aplicado a la columna fue de 25 ml/h y se colectaron fracciones de 3 ml. Con la finalidad de estabilizar a la enzima, en ésta y las siguientes etapas, las fracciones eluidas de las columnas de cromatografía se colectaron en tubos conteniendo glicerol de modo que la concentración final del mismo fuera aproximadamente 50 % (v/v). Las fracciones del pico de actividad se reunieron (Fracción F5) y se cromatografiaron inmediatamente en Fosfocelulosa.

Quinta etapa: Segunda Cromatografía en Fosfocelulosa

La Fracción F5 (16 ml), con una conductividad equivalente a 0,03M de sulfato de amonio, se aplicó directamente a una columna de Fosfocelulosa P-11 (0,85 x 3,50 cm) previamente equilibrada con Buffer B conteniendo 0,07M de sulfato de amonio. La columna fue lavada con 3 volúmenes del mismo buffer y la enzima fue concentrada por elución con 0,50M de sulfato de amonio en Buffer B. Se colectaron fracciones de 0,4 ml a un flujo de 4,5 ml/h. Las fracciones con actividad de RIA polimerasa se reunieron (Fracción F6) y se utilizaron inmediatamente en la próxima cromatografía.

Sexta etapa: Cromatografía en Sepharosa 6B

La Fracción F6 (16 ml) obtenida de la etapa precedente se aplicó a una columna de Sepharosa 6B (1 x 35 cm) equilibrada con Buffer B conteniendo 0,15M de sulfato de amonio y se eluyó con el mismo buffer a un flujo de 3 ml/hora. Se colectaron fracciones de 1,15 ml. Las fracciones con actividad enzimática se reunieron (Fracción F7) y se cromatografiaron inmediatamente en Fosfocelulosa.

Septima etapa: Tercera Cromatografía en Fosfocelulosa

La Fracción F7 (10 ml) precedente de la etapa anterior fué diluída con Buffer B hasta que la concentración de sulfato de amonio era de 0,075M y se adsorbió a una columna de Fosfocelulosa P-11 (0,85 x 1,8cm) previamente equilibrada con Buffer B conteniendo 0,070M de sulfato de amonio. La resina fue lavada con 3 volúmenes de columna del buffer de equilibración y la enzima fue eluída con 7 volúmenes de columna de un gradiente lineal de 0,07 a 0,50M de sulfato de amonio en Buffer B. Se colectaron fracciones de 0,4 ml y el flujo aplicado a la columna fue de 4,5 ml/hora. Se tomaron alícuotas iguales de cada una de las fracciones para ser analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida y el volumen restante de las fracciones con actividad enzimática se reunió para la determinación de la actividad de polimerasas y contenido en proteínas.

2) Electroforesis en Geles de Poliacrilamida

Alícuotas de algunas de las fracciones eluídas de la tercera cromatografía en Fosfocelulosa se analizaron individualmente por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones no denaturalizantes como se describe en "Materiales y Métodos" de la Primera Sección, (PARTE II).

Resultados y Discusión

La Tabla X resume el procedimiento de purificación de la RNA polimerasa I. Las RNA polimerasas fueron solubilizadas de los núcleos aislados por sonicación a alta fuerza iónica y parcialmente purificadas por centrifugación diferencial y precipitación con sulfato de amonio, como se describe en "Métodos". La mayor recuperación de la actividad enzimática en la Fracción F2 se debe presumiblemente a la eliminación de componentes inhibitorios. Las RNA polimerasas I y II presentes en la Fracción F2 fueron resueltas por una etapa inicial de cromatografía en DEAE-Sephadex (Figura 27) que, como se describió en la PARTE I, permite la efectiva separación de estas dos enzimas. En esta etapa el pico de actividad de la polimerasa I es ligeramente heterogéneo. El grado de heterogeneidad depende de la preparación de enzima y es independiente de las condiciones de incubación de las células (comparar Figuras 3, 14 y 15). Como se indicó previamente (Primera Sección, PARTE II), la heterogeneidad de la enzima I también se manifiesta en la próxima etapa de purificación consistente en una cromatografía en Fosfocelulosa. Como se ilustra en la Figura 28, usualmente el pico de actividad de la enzima presenta un "hombro" en la zona de menor concentración salina. La RNA polimerasa I fue luego purificada por una segunda cromatografía en DEAE-Sephadex. La enzima fue eluída de la columna utilizando un gradiente salino menos pronunciado que el empleado en la primera DEAE-Sephadex. En esta etapa de purificación, en la mayoría de los experimentos, no se detectó heterogeneidad en la enzima a pesar de que las condiciones cromatográficas fueron más discriminatorias (Figura 29). La polimerasa I eluída de la columna de DEAE-Sephadex fué luego adsorbida a una pequeña columna de Fosfocelulosa y eluída con Buffer B conteniendo 0,5M de sulfato de amonio con la finalidad de concentrar la preparación de enzima (Figura 30), para aplicarla luego a una columna de Sepharose 6B. Esta última columna fue desarro

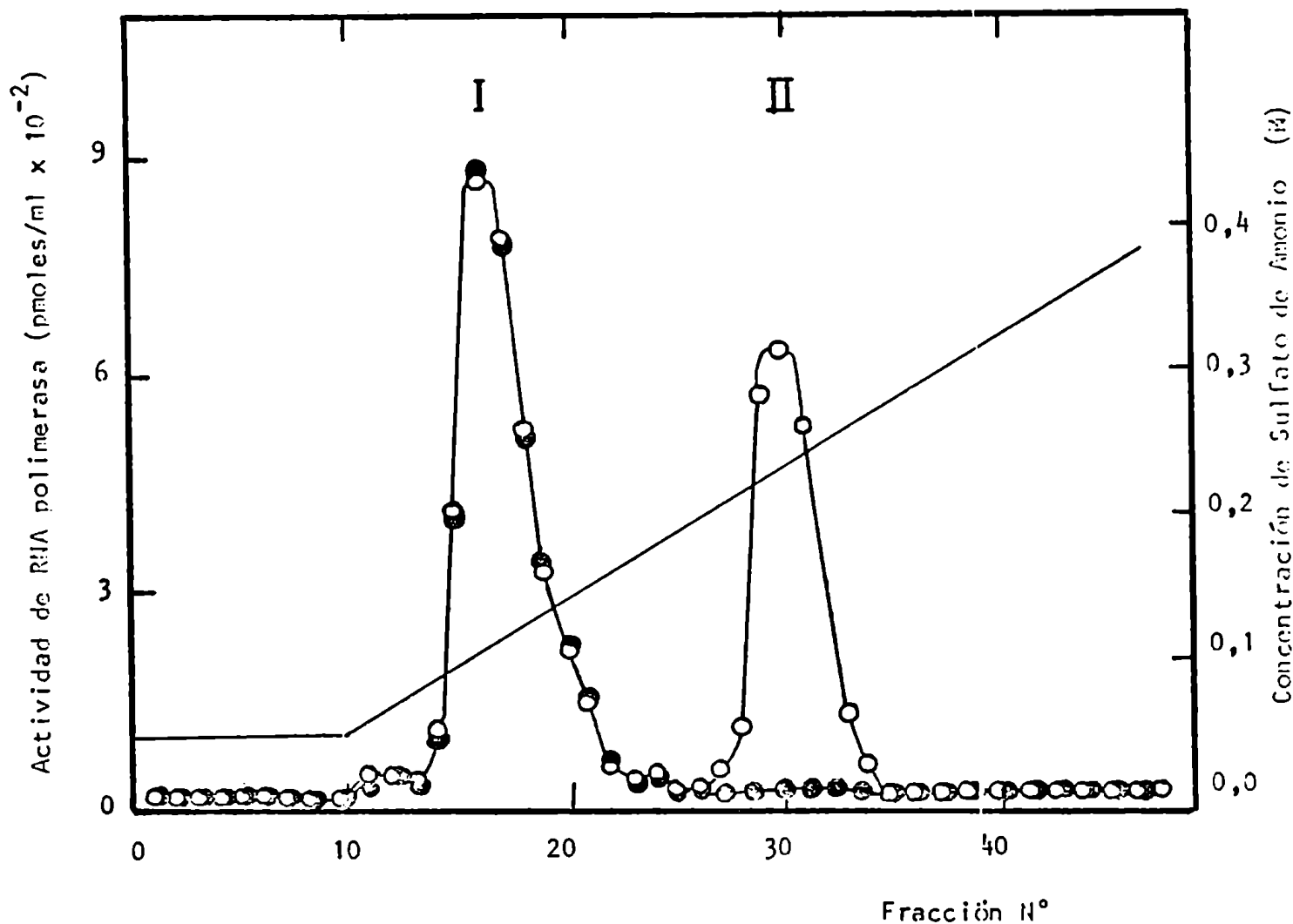


Figura 27: Primera Cromatografía en DEAE-Sephadex

La Fracción F2 (853 mg de proteína) obtenida de 50 g de células fue cromatografiada en una columna de DEAE-Sephadex (4,4 x 18 cm) como se indica en "Métodos". Se colectaron fracciones de 40 ml (Fracciones 1 a 7) y de 20 ml (Fracciones 8 a 48) a un flujo de 3 ml/min. La actividad de RNA polimerasa se determinó en alícuotas de 10 µl a 0,01 mM UTP y a la concentración de sulfato de amonio resultante de la dilución de este volumen en el volumen final de 50 µl de la mezcla de reacción. Las actividades mostradas representan los picomoles totales de UMP incorporados por ml en 10 min. Los valores de actividad para los picos I y II eran 2,7 veces mayores cuando se los determina a 0,10 mM UTP. En presencia de DNA denaturalizado, la actividad asociada al pico I es aproximadamente la mitad y la asociada al pico II 4-5 veces mayor (ver Tabla VI, PARTE I). Las fracciones correspondientes al primer pico de actividad se reunieron, se concentraron por precipitación con sulfato de amonio (Fracción F3) y luego se determinó la actividad de RNA polimerasa y contenido en proteínas (Tabla X). Actividad de RNA polimerasa en ausencia (○-○) y en presencia (●-●) de 1 µg/ml de α-amanitina. (—) Concentración de sulfato de amonio.

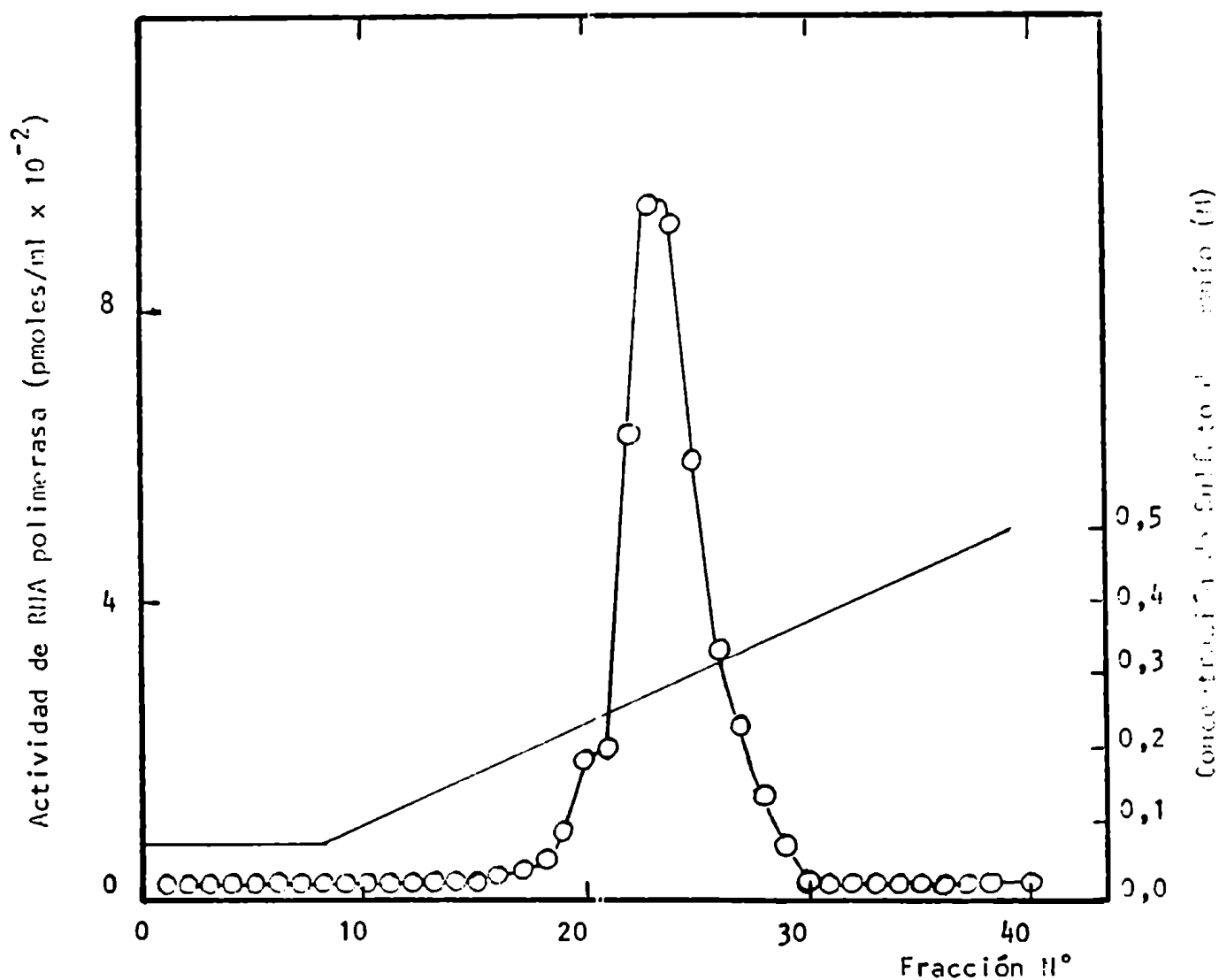


Figura 28: Primera Cromatografía en Fosfocelulosa

La Fracción F3 (Figura 27) conteniendo 124 ng de proteínas y 155 unidades de actividad se cromatografió en una columna de Fosfocelulosa (2,4 x 11,5 cm) como se describe en "Métodos". Se colectaron fracciones de 10 ml (Fracciones 1 a 7) y de 6 ml (Fracciones 8 a 40) a un flujo de 30 ml/hora y la actividad de RIA polimerasa (—○—○—) determinó como se indica en la Figura 27. Las fracciones con actividad de polimerasa se reunieron, se concentraron por precipitación con sulfato de amonio (Fracción F4) y luego se determinó la actividad de RIA polimerasa y contenido en proteínas (Tabla X). (—) Concentración de sulfato de amonio.

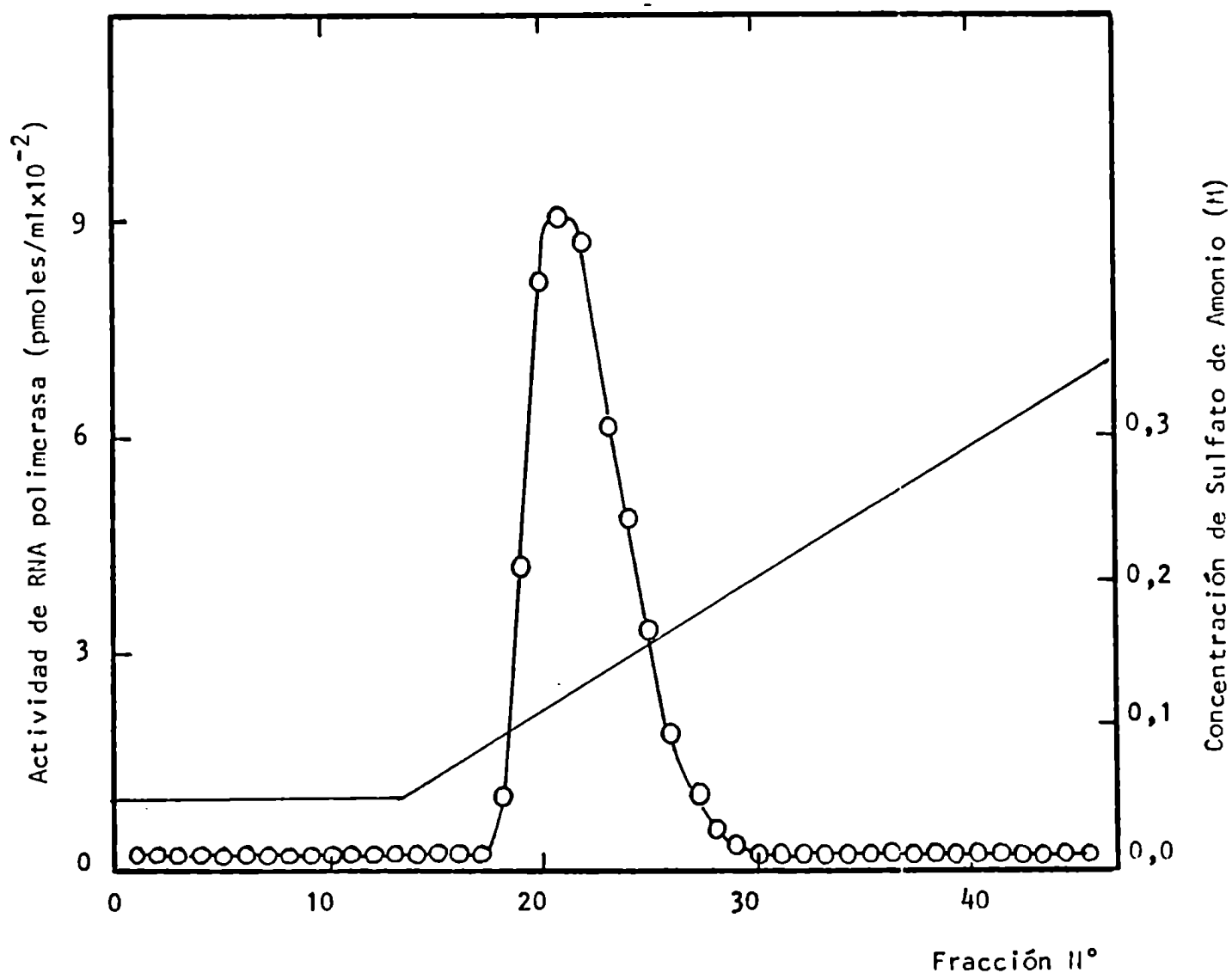


Figura 29: Segunda Cromatografía en DEAE-Sephadex

La Fracción F4 (Figura 28) conteniendo 23 mg de proteínas y 59 unidades de actividad se cromatografió en una columna de DEAE-Sephadex (1,6 x 12 cm) como se describe en "Métodos". La actividad de la RNA polimerasa (—○—) se determinó como se indica en la Figura 27. Las fracciones del pico de actividad se reunieron (Fracción F5) y se determinó la actividad de RNA polimerasa y contenido de proteínas (Tabla X). (—) Concentración de sulfato de amonio.

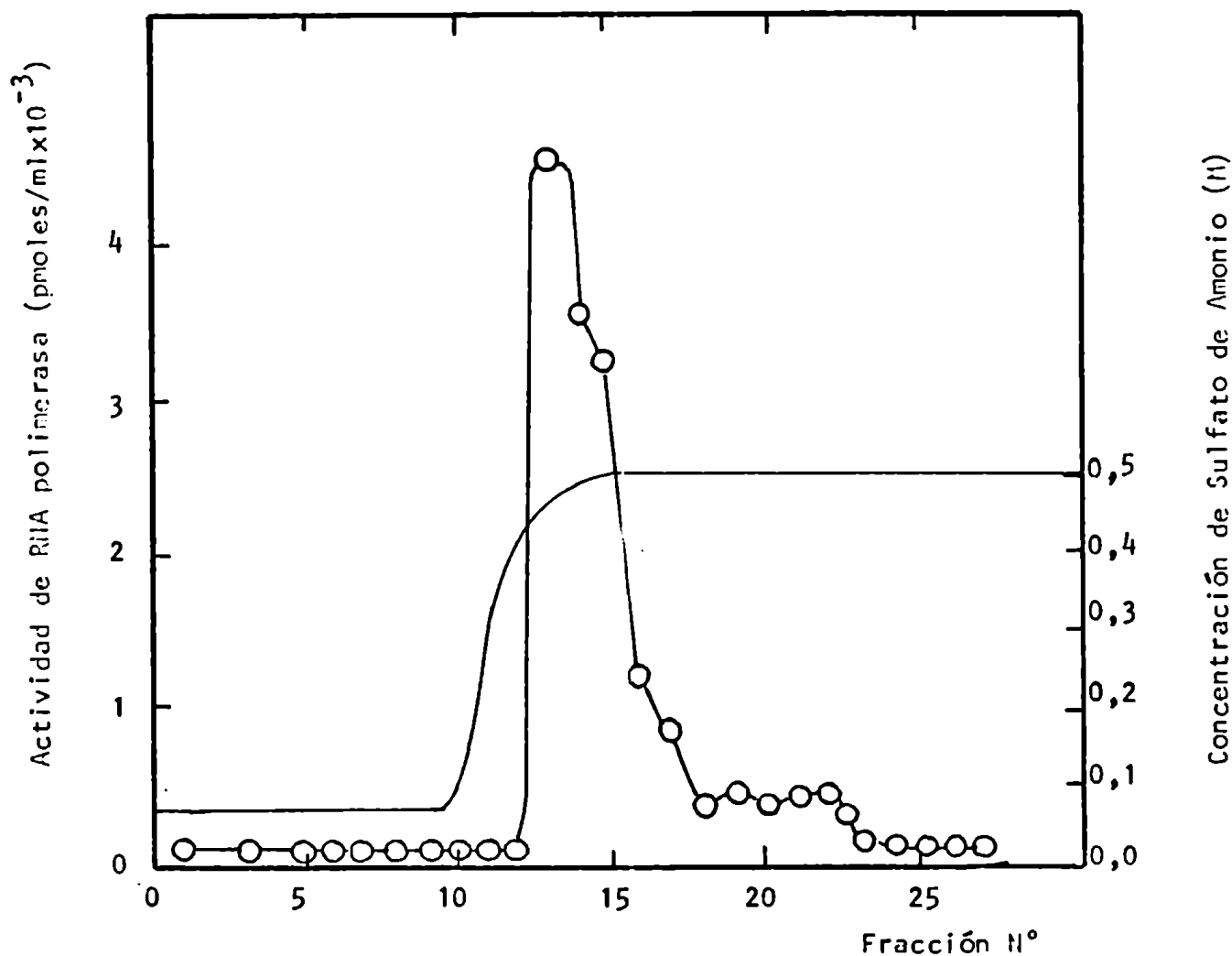


Figura 30: Segunda Cromatografía en Fosfocelulosa

La Fracción F5 conteniendo 2,6 mg de proteínas y 29 unidades de actividad se aplicó a una columna de Fosfocelulosa (0,85 x 3,50 cm). La enzima se eluyó como se describe en "Métodos". La actividad de polimerasa (—○—) se determinó en alícuotas de 3 μ l como se indica en la Figura 27. Las fracciones del pico de actividad se reunieron (Fracción F6) y luego se determinó la actividad de RNA polimerasa y contenido en proteínas (Tabla X). (—) Concentración de sulfato de amonio.

llada con Buffer B conteniendo 0,15M sulfato de amonio. La RNA polimerasa I eluyó en un solo pico simétrico, ligeramente antes que la proteína marcadora de peso molecular 432.700 daltons (Figura 31). Por este procedimiento se logró una buena purificación con una recuperación de toda la actividad enzimática (Tabla X). La etapa final de purificación fue la adsorción de la enzima de la columna de Sepharose 6B a una tercer columna de Fosfocelulosa y elución con un gradiente lineal de sulfato de amonio. Toda la actividad eluyó entre 0,21M y 0,31M de sulfato de amonio en un solo pico homogéneo (Figura 32). Alícuotas de algunas de las fracciones eluidas de esta última columna fueron analizadas individualmente por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones no denaturalizantes (Figura 33). Se observa una única banda de proteína coincidente con las fracciones con actividad de RNA polimerasa I indicando que la enzima así purificada es razonablemente homogénea.

Por el procedimiento de purificación descrito previamente la RNA polimerasa I fue purificada 2300 veces con respecto a los extractos nucleares (Tabla X). La actividad específica de la fracción de enzima más pura obtenida después de la tercer cromatografía en Fosfocelulosa es similar a la indicada para la RNA polimerasa I altamente purificada de mieloma de ratón (Schwartz y Roeder, 1974), de timo de ternero (Gissinger y Chambon, 1972) y otros eucariotes inferiores (Buhler y col, 1974; Valenzuela y col, 1976). La RNA polimerasa I exhibe un progresivo incremento de inestabilidad en las sucesivas etapas de purificación después de la primera cromatografía en DEAE-Sephadex. Un aumento en la estabilidad enzimática se logró mediante la adición de dextranos y de altas concentraciones de glicerol en todos los buffers utilizados, manteniendo las soluciones de enzima en la forma más concentrada posible y demás precauciones indicadas previamente. La preparación de enzima final congelada a -80°C en Buffer B conteniendo 60 % de glicerol mantiene toda la actividad durante 2-3 días. Por este procedimiento de purificación se recupera del 6 al 10 % de la acti-

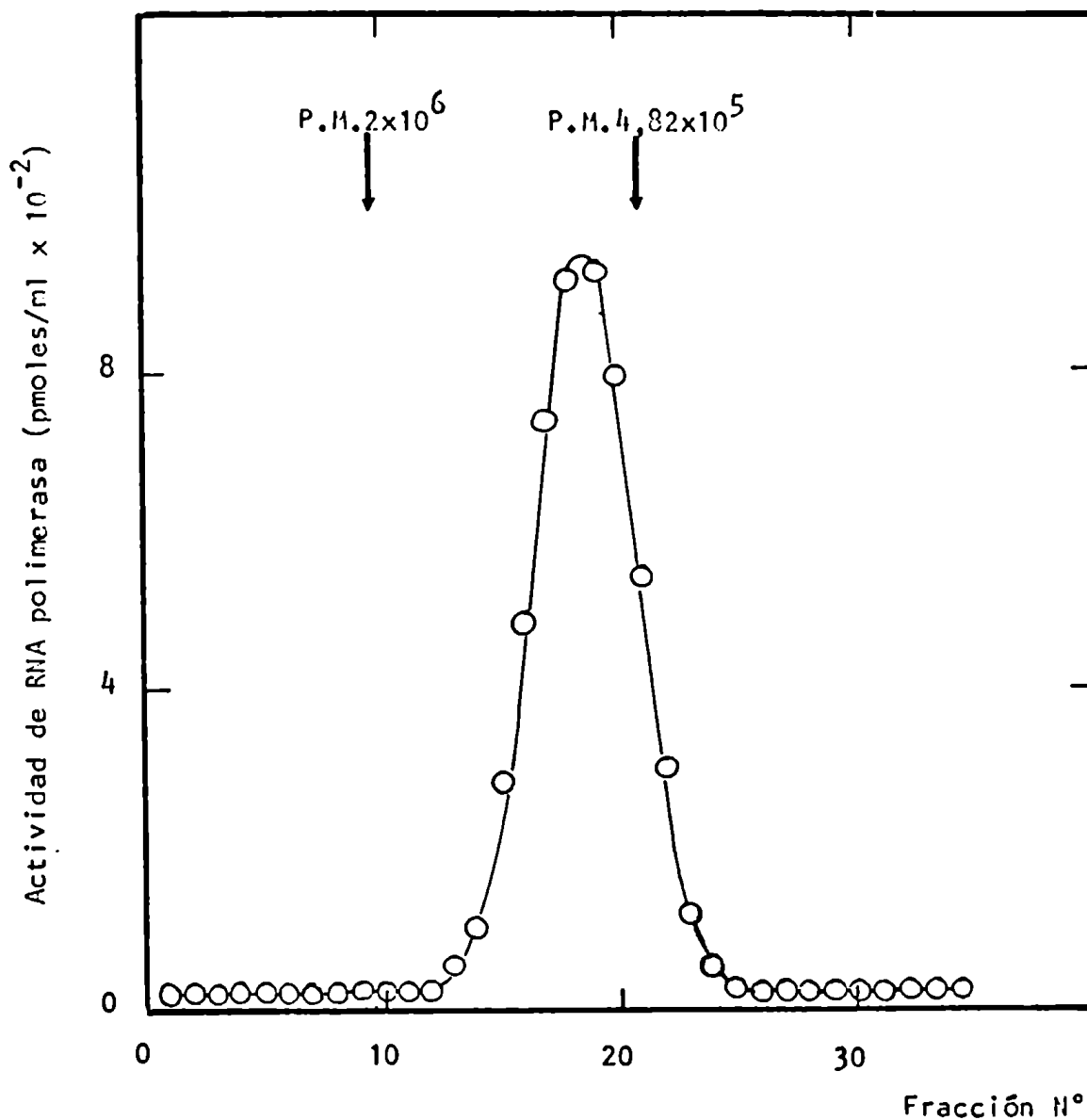


Figura 31: Cromatografía en Sepharose 6B

La Fracción F6 (Figura 30) conteniendo 1,35 mg de proteínas y 14 unidades de actividad fue aplicada a una columna de Sepharose 6B (1 x 32,5 cm) y eluída como se describe en "Métodos". La actividad de RNA polimerasa (—○—) se determinó como se describe en la Figura 27. Las fracciones del pico de actividad se reunieron (Fracción F7) y luego se midió la actividad de polimerasa y contenido en proteínas (Tabla X). Las flechas indican la posición de elución del Azul Dextran 2000 (Pharmacia) (MW 2×10^6) y de la ureasa (MW $4,872 \times 10^5$).

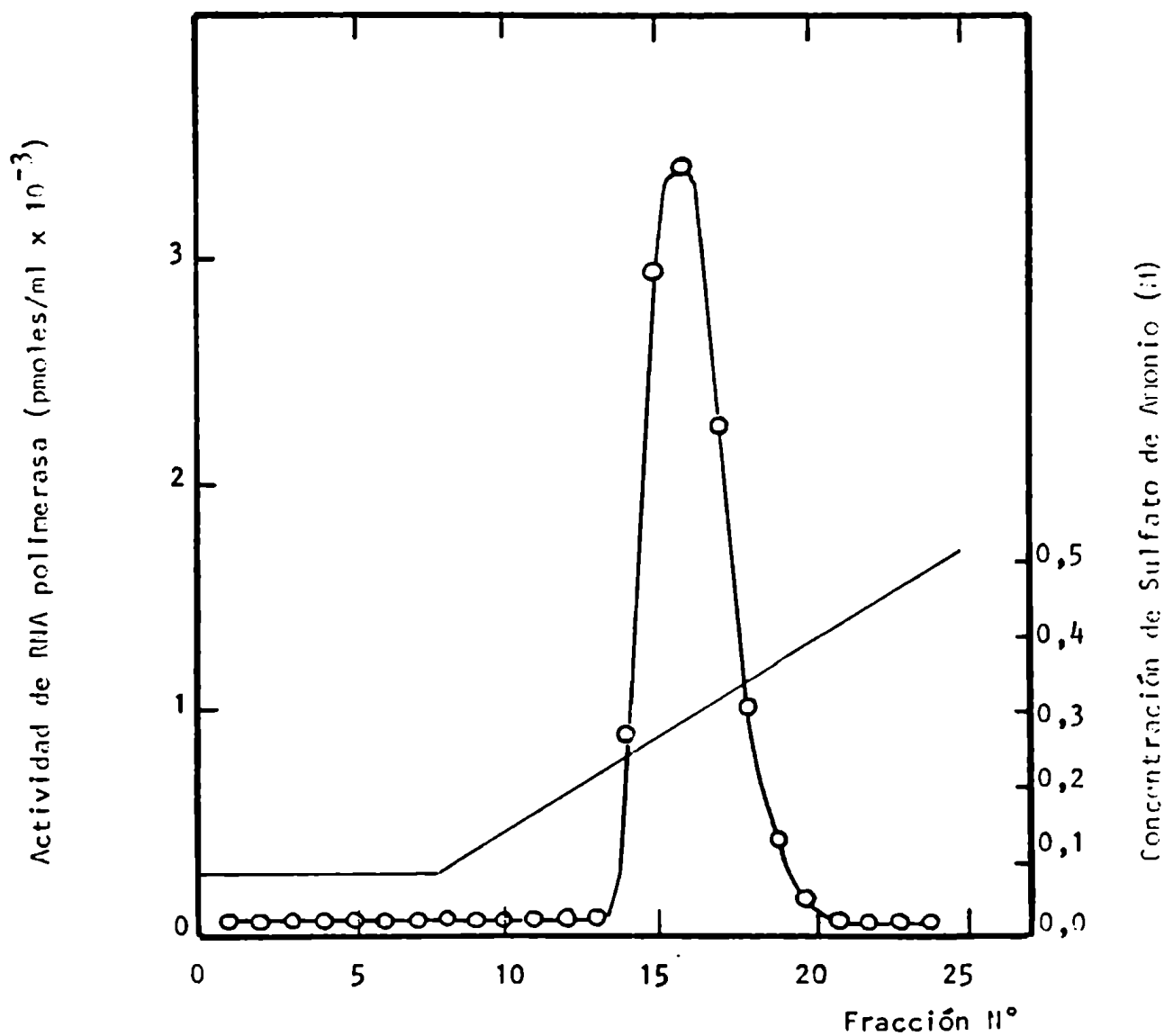


Figura 32: Tercera Cromatografía en Fosfocelulosa

La Fracción F7 (Figura 31) conteniendo 0,26 mg de proteínas y 15 unidades de actividad se cromatografió en una columna de Fosfocelulosa (0,85 x 1,8 cm) como se describe en "Métodos". La actividad de RNA polimerasa (O—O—O) se determinó como en la Figura 27. Se tomaron alícuotas iguales de cada una de las fracciones eluidas de la columna para ser analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida y el volumen restante de las fracciones con actividad enzimática se reunió y se determinó el contenido en proteínas y actividad de RNA polimerasa (Tabla X). (—) Concentración de sulfato de amonio.

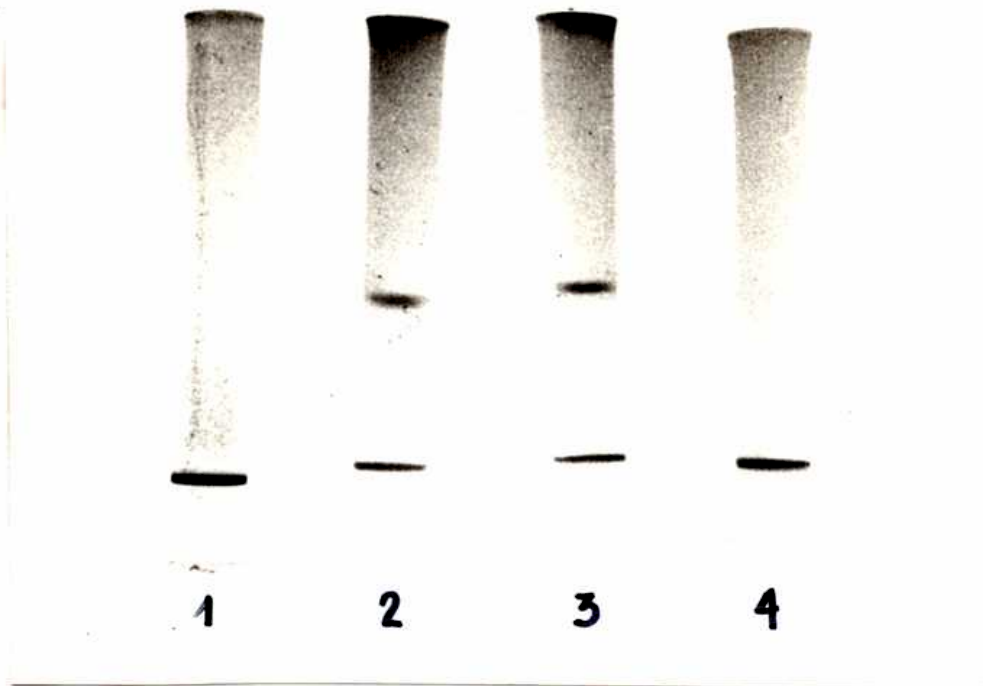


Figura 33: Electroforesis en Geles de poliacrilamida en condiciones no denaturalizantes de la RNA polimerasa I purificada.- Aliquotas de las Fracciones 16, 17 y 21 eluidas de la tercer cromatografía en Fosfocelulosa (Figura 32), conteniendo aproximadamente 0,30 unidades de enzima (Gel 2), 0,23 unidades de enzima (Gel 3) y ninguna actividad enzimática (Gel 4) se analizaron por electroforesis en geles con 5 % de acrilamida en condiciones no denaturalizantes como se describe en "Métodos". En el Gel 1 se corrió en forma simultánea una alícuota similar del buffer de elución de la columna. La RNA polimerasa I exhibe una marcada tendencia a la agregación durante la electroforesis cuando ésta se realiza en las condiciones indicadas más arriba.

TABLA X : Procedimiento de Purificación de la RNA polimerasa I de células de tumor ascítico de Ehrlich

Fracción y Etapa de Purificación	Proteína mg	Actividad Total unidades	Actividad específica unid/mg prot.	Recuperación %
F1	1331	135	0,10	77
F2	853	176	0,21	100
F3 Primera DEAE-Sephadex	124	155	1,25	88
F4 Primera Fosfocelulosa	23	59	2,6	34
F5 Segunda DEAE-Sephadex	2,6	29	11	16
F6 Segunda Fosfocelulosa	1,35	14	10	8
F7 Sepharose 6B	0,26	15,4	59	9
F8 Tercera Fosfocelulosa	0,05	11,6	230	7

- Los datos resumen la purificación de la RNA polimerasa I aislada de 50 g de células de tumor ascítico de Ehrlich. La actividad de RNA polimerasa fue determinada como se indica en "Métodos", con concentraciones saturantes de UTP (0,10 mM). La concentración de sulfato de amonio en la mezcla de reacción varió de 20 a 40 mM dependiendo de la fracción de enzima ensayada. La actividad en las Fracciones F1 y F2 se midió en presencia de 4 μ g/ml de α -amanitina. La actividad resistente a esta toxina representa a la RNA polimerasa I, pues no se observa una posterior inhibición de la actividad cuando los ensayos se realizaron con 200 μ g/ml de α -amanitina. (Schwartz y col, 1974; Weil y Blatti, 1976) (ver PARTE I). Las unidades de actividad se definen en "Métodos". Los datos aquí mostrados se tomaron de un experimento representativo.

vidad inicial de RNA polimerasa I (Tabla X), porcentaje que es alto, ya que esta enzima ha sido purificada en otros sistemas con una recuperación final de la actividad que oscila entre 2 y el 15 % (Gissinger y Chambon, 1972; Schwartz y Roeder, 1974; Valenzuela y col, 1976). Nótese que de 1330 mg de proteínas iniciales se obtienen 50 μ g de enzima pura. Rendimientos similares se han indicado en otras células eucarióticas (Gissinger y Chambon, 1972; Schwartz y Roeder, 1974). Este rendimiento es uno o dos órdenes de magnitud menores que el obtenido en la purificación de la RNA polimerasa de bacterias e ilustra una de las principales dificultades en el estudio de la regulación de la transcripción a nivel molecular en eucariotes.

Como se indicó previamente (PARTE I), en varios sistemas de eucariotes se ha descrito una heterogeneidad cromatográfica en las fracciones de RNA polimerasa I. En células de tumor ascítico de Ehrlich también encontramos dos formas de RNA polimerasa I. Estas dos formas se evidenciaron únicamente cuando los extractos nucleares crudos se cromatografiaron directamente en Fosfocelulosa (Figura 19). Si los extractos nucleares crudos son sometidos a una etapa previa de purificación en DEAE-Sephadex, la cromatografía en Fosfocelulosa ya no resuelve a la polimerasa I en dos formas de enzima, sino que se obtiene un sólo pico de actividad ligeramente heterogéneo (Figuras 20 y 28). Cierta heterogeneidad cromatográfica también se manifiesta en otras resinas como DEAE-Sephadex (Figura 27) y QAE-Sephadex (Figura 21), pero solamente en las primeras etapas de purificación. En ningún caso se encontró heterogeneidad en las fracciones de enzima más purificadas (Figuras 22, 25, 32). Este último resultado puede deberse, entre otras posibilidades, a la pérdida selectiva de una forma de enzima debido a una mayor inestabilidad o a la interconversión de una forma en otra por proteólisis alteraciones conformacionales o pérdida de componentes específica o inespecíficamente unidos. Hasta el momento no tenemos evidencias en favor de alguna de estas posibilidades. Debe destacarse, que el grado de heterogeneidad de la polimerasa I detectado en las primeras etapas de l

procedimiento de purificación descrito previamente depende de la preparación de enzima y no tiene relación alguna con la capacidad de transcripción de los núcleos aislados.

Los análisis de la RNA polimerasa I altamente purificada de plasmacitoma por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones no denaturalizantes revelaron dos bandas de proteína (Schwartz y Roeder, 1974). Sin embargo, sólo una banda se encontró cuando se analizaron las fracciones más purificadas de la polimerasa I de tipo de ternero y de células de tumor ascítico de Ehrlich (Gissinger y Chambon, 1972 y presente estudio). Los análisis electroforéticos mostrados en el presente estudio fueron realizados con la enzima purificada de células de tumor ascítico de Ehrlich no incubadas que presentan bajos niveles de síntesis del rRNA (Franze-Fernández y Pogo, 1971; Iapalucci-Espinoza y col, en prensa). Sería importante determinar si las enzimas purificadas de núcleos con alta y baja capacidad de transcripción del rRNA presentan bandas con diferente movilidad electroforética y examinar la composición en subunidades de estas enzimas.

RESUMEN DE LA PARTE II

La RNA polimerasa DNA dependiente fue solubilizada de los núcleos aislados de células de tumor ascítico de Ehrlich y purificada por un procedimiento que comprende una precipitación inicial con sulfato de amonio, seguida por cromatografías en DEAE-Sephadex y Fosfo-celulosa y filtración por geles en Sepharose 6B. Por este método se obtuvo una enzima cromatográficamente homogénea que fue purificada aproximadamente 2.300 veces con respecto a los extractos nucleares. La actividad específica de la fracción más pura de enzima (230 nmol de $[^3\text{H}]$ -UTP incorporados en RIA por ng de proteína en 10 min a 37°C) es comparable a la indicada para la RNA polimerasa I altamente purificada de mieloma de ratón (Schwartz y Roeder, 1974) y ti-mo de ternero (Gissinger y Chambon, 1972). La posición de elución en la filtración por geles en Sepharose 6B indicó un peso molecular de aproximadamente 580.000 daltons. Los análisis de la enzima purificada por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones no denaturalizantes revelaron una sola banda de proteínas. Cierta heterogeneidad en las fracciones de la RNA polimerasa I se encontró en las primeras etapas cromatográficas, pero no en las fracciones de enzima más purificada.

P. Guadalupe

J. Cepeda

BIBLIOGRAFIA

- Bell, G.L., Valenzuela, P. y Rutter, W.J. (1976) *Nature* 261, 429-431
- Benecke, B.J., Ferencz, A. y Seifart, K.H. (1973) *FEBS Letters* 31, 53-58
- Blair, D.G.R. y Dommasch, H. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 49, 877-883
- Blatti, S.P., Ingles, C.J., Lindell, T.J., Morris, P.M., Weaver, R.F., Weinberg, F. y Rutter, W.J. (1970) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 35, 649-657
- Bühler, J.M., Sentenac, A. y Fromageot, P. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 5963-5970
- Burdon, R.H. (1971) *Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 11, 33-79
- Burton, K. (1956) *Biochem. J.* 62, 315-323
- Butterworth, P.H.W., Cox, R.F. y Chesterton, C.J. (1971) *Eur. J. Biochem.* 23, 229-241
- Cashel, H. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 3133-3141
- Cashel, H. (1975) *The Pan-American Association of Biochemical Societies (PAABS, revista)* Vol 4, 525-529
- Cashel, H. y Gallant (1969) *Nature* 221, 838-841
- Coupar, B.E.H. y Chesterton, C.J. (1975) *Eur. J. Biochem.* 59, 25-34
- Cox, R.F., Haines, H.E., Carey, H.H. y Catlin, G.H. (1973) *Eur. J. Biochem.* 32, 513-524
- Craig, H.C. y Perry, R.P. (1970) *J. Cell Biol.* 45, 554-564
- Cunningham, D. y Pardee, A.B. (1969) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 64, 1049-1056
- Chambon, P. (1974) *The Enzymes*, Vol X (Boyer, P.D. ed), Pag. 261-331, Academic Press, New York.
- Chambon, P. (1975) *Ann. Rev. Biochem.* 44, 614-639
- Chambon, P., Gissinger, F., Kedinger, C., Mandel, J.L., y Meilhac, H. (1974) *The Cell Nucleus* (Busch, H. ed), Pag. 270-307, Academic Press, New York
- Chambon, P., Gissinger, F., Mandel, J.L., Kedinger, C., Gniazdowski, H. y Meilhac, H. (1970) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 35, 649-657
- Chesterton, C.J. y Butterworth, P.H.W. (1971) *Eur. J. Biochem.* 19, 232-241
- Chesterton, C.J., Coupar, B.E.H., Butterworth, P.H.W., Buss, J. y Green, H.H. (1975) *Eur. J. Biochem.* 57, 79-83
- Darnell, J.E., Pagoulatos, G.H., Lindberg, U. y Balint, R. (1970) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 35, 555-560

C O N T E N T S

r

- Emerson, C.P. Jr. (1971) *Nature New Biol.* 232, 101-106
- Fangman, W., y Heidhart (1964) *J. Biol. Chem.* 239, 1844-1847
- Ferencz, A. y Seifart, K.H. (1975) *Eur. J. Biochem.* 53, 605-613
- Franze-Fernández, M.T. v Fontanive-Sanglles, A.V. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 331, 71-80
- Franze-Fernández, M.T., Mordoh, J. y Fridlender, B.R. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 65, 1409-1417
- Franze-Fernández, M.T., y Pogo, A.O. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68, 3040-3044
- Froehner, S.C. y Bonner, J. (1973) *Biochemistry* 12, 3064-3071
- Girard, H., Latham, H., Penman, S. y Darnell, J.E. (1965) *J. Mol. Biol.* 11, 187-201
- Gissinger, R. y Chambon, P. (1972) *Eur. J. Biochem.* 28, 277-282
- Gornicki, S.Z., Vuturo, S.B., West, T.V. y Weaver, R.F. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 1792-1798
- Gross, K.J. y Pogo, A.O. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 568-576
- Grumt, I., Smith, V.A. y Grumt, F. (1976) *Cell* 7, 439-445
- Haseltine, W.A. y Block, R. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 1564-1568
- Haseltine, W.A., Block, R., Gilbert, W. y Weber, K. (1972) *Nature* 238, 381-385
- Hirs, C.H.W. (1967) *Methods Enzymol.* 11, 325-329
- Hossenlopp, P., Wells, D. y Chambon, P. (1975) *Eur. J. Biochem.* 58, 237-251
- Iapalucci-Espinoza, S., Cereghini, S. y Franze-Fernández, M.T. (1977) *Biochemistry* (en prensa)
- Jacob, S.T. (1973) *Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* 13, 93-136
- Jaehning, J.A., Stewart, C.C. y Roeder, R.G. (1975) *Cell* 4, 51-57
- Keding, C., Gissinger, F., Gniazdowski, H., Mandel, J.L. y Chambon, P. (1972) *Eur. J. Biochem.* 28, 269-276
- Keding, C., Gniazdowski, H., Mandel, J.L., Gissinger, F. y Chambon, P. (1970) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 39, 165-171
- Keding, C., Nuret, P. y Chambon, P. (1971) *FEBS Letters* 15, 169-173
- Lindell, T.J., Wienberg, F., Morris, P.W., Roeder, R.G. y Rutter, W.J. (1970) *Science* 170, 447-449

- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, J.R. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275
- Maizel, J.V. (1969) in Fundamentals techniques in virology (Habel, K. y Salzman, N.P., eds.) Pag. 334-347, Academic Press, New York
- McCarthy, B.J. (1967) Bacteriol. Rev. 31, 215-229
- Meilhac, M. y Chambon, P. (1973) Eur. J. Biochem. 35, 454-463
- Muramatsu, M., Shimada, H. y Higashinakaçawa, T. (1970) J. Mol. Biol. 53, 91-106
- Neidhart, F.C., (1966) Bacteriol. Rev. 30, 701-719
- Onishi, T. (1970) Biochim. Biophys. Acta 217, 384-393
- Peterson, E.A. (1970) Cellulosic Ion Exchangers (Work, T.S. y Work, E., eds.) Pag. 262, North Holland, Amsterdam
- Reeder, R.H. y Roeder, R.G. (1972) J. Mol Biol. 67, 433-441
- Roeder, R.G. y Rutter, W.J. (1969) Nature 224, 234-237
- Roeder, R.G. y Rutter, W.J. (1970) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 65, 675-682
- Rubin, C.S. y Rosen, O.M. (1975) A. Rev. Biochem. 44, 831-837
- Rutter, W.J. (1975) The Pan-American Association of Biochemical Societies (PAABS, revista) Vol 4, 165-173
- Sajdel, E.M. y Jacob, S.T. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 45, 707-715
- Schwartz, L.B. y Roeder, R.G. (1974) J. Biol. Chem. 249, 5898-5906
- Schwartz, L.B., Sklar, V.E.F., Jaehning, J.A., Weinmann, R. y Roeder, R.G. (1974) J. Biol. Chem. 249, 5889-5897
- Sergeant, A. y Kršmanovic, V. (1973) FEBS Letters 35, 331-335
- Sethi, S.V. y Gallo, R.C. (1975) Biochim. Biophys. Acta 378, 269-281
- Shields, R. y Korner, A. (1970) Biochim. Biophys. Acta. 204, 521-530
- Shields, D. y Tata, J.R. (1973) FEBS Letters 31, 209-213
- Somers, D.G., Pearson, H.L. y Ingles, C.J. (1975) J. Biol. Chem. 250, 4825-4831
- Stein, H. y Hausen, P. (1970) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 709-713
- Sudgen, S. y Keller, W. (1973) J. Biol. Chem. 248, 3777-3783
- Tata, J.R. (1966) Prog. Nucleic. Acid Res. Hd. 5, 191-250
- Travers, A. (1976) Nature 263, 641-646
- Udvardy, A. y Seifart, H.H. (1976) Eur. J. Biochem. 62, 353-363

- Valenzuela, P., Weinberg, F., Bell, G. y Rutter, W. J. (1976)
J. Biol. Chem. 251, 1464-1470
- Versteegh, L. R. y Warner, C. (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. 53, 838-844
- Warner, J. R. y Soeiro, R. (1967) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 58, 1984-1990
- Weil, P. A. y Blattli, S. P. (1975) Biochemistry 14, 1636-1642
- Weil, P. A. y Blattli, S. P. (1976) Biochemistry 15, 1500-1509
- Weimann, R. y Roeder, R. G. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 1790-1794
- Willems, H. Penman, H y Penman, S. (1969) J. Cell Biol. 41, 177-187
- Young, H. A. y Whiteley, H. R. (1975) J. Biol. Chem. 250, 479-487
- Yu, F. L. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. 64, 1107-1115
- Yu, F. L. y Feigelson, P (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 2833-2837
- Zilling, W. ^{y col.} (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 2506-2510
- Zimmerman, E. F. y Holler, B. W. (1967) J. Mol. Biol. 23, 149-161
- Zylber, E. A. y Penman, S. (1971) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 2861-2865