

Tesis de Posgrado

Identificación química e inmunológica de la proteína inducida por estrógeno en útero de rata inmadura

Pastini, Ana Cristina

1988

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas 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:

Pastini, Ana Cristina. (1988). Identificación química e inmunológica de la proteína inducida por estrógeno en útero de rata inmadura. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2136_Pastini.pdf

Cita tipo Chicago:

Pastini, Ana Cristina. "Identificación química e inmunológica de la proteína inducida por estrógeno en útero de rata inmadura". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1988. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2136_Pastini.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

"IDENTIFICACION QUIMICA E INMUNOLOGICA
DE LA PROTEINA INDUCIDA POR ESTROGENO
EN UTERO DE RATA INMADURA"

AUTOR: Ana Cristina Pastini
DIRECTOR: Dr. S.A.Kumar
CODIRECTOR: Dr. Eduardo Charreau
LUGAR DE TRABAJO: Wadsworth Center for Laboratories
and Research, Dept. of Health,
Albany, NY, USA.

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE

DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

1988

2.136
Ej. 2

2136

A mi compañero y amigo Juan Carlos.

A mis padres.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. S.A.Kumar, quien enriqueció mi persona con sus conocimientos y quien hizo posible la realización de esta tesis.

A la Dra. María Tomio, quien con eficiencia y predisposición respondió a mis cartas y concretó mi admisión al Doctorado.

A Thaisa Beach, al Dr. H.W.Dickerman y a su esposa quienes me apoyaron en los momentos de duda.

Al Dr. H.H.Torres, por ocuparse de la 'Educación y la Ciencia en Argentina' y por dispensarme el tiempo que requirió el análisis y crítica de este manuscrito.

Al Dr. Eduardo Charreau por el análisis y crítica de este manuscrito.

A mis hijos a quienes privé de tiempo material, pero para quienes todos mis esfuerzos están dirigidos.

INDICE

INTRODUCCION

PrI: Potencial Marcador de la Acción Temprana de los Estrógenos	1
a.1- Ubicación e Importancia de la PrI en la secuencia de Eventos Inducidos en Utero de Rata por Acción de los Estrógenos	2
a.2- La Síntesis de la PrI en los Tejidos Uterinos	17
a.3- Otras Proteínas como Potenciales Marcadores de la Acción Temprana de los Estrógenos	20
a.4- Purificación y Caracterización de la PrI y del ARN-m de la PrI	22
b- Creatina Quinasa	36
b.1- Las Isoenzimas de la Creatina Quinasa	38
b.2- La Creatina Quinasa en el Transporte de Energía	41
c- Objetivos de esta Tesis Doctoral	44

MATERIALES Y METODOS

1- Purificación de la CK-BB de Cerebro de Rata Prepuber	45
1.1- Obtención del Homogenato Inicial	45
1.2- Cromatografía en Columna	46
1.2.1- Cromatografía de Intercambio Iónico	46
1.2.2- Cromatografía de Adsorción en Hidroxiapatita Ultrogel (HAU)	47
1.2.3- Cromatografía de Adsorción en Hidroxiapatita (HTP)	48

2-	Obtención de Inmunosuero	48
3-	Purificación de las IgG de sueros de Conejos por Columna de Proteína A-Sepharosa	50
4-	Inmunodifusión Bidimensional: Ouchterlony	51
5-	Digestiones Químicas	52
5.1-	Digestión con Acido Fórmico 88%	52
5.2-	Digestión con Acido Fórmico 70%	52
5.3-	Digestión con Acido Clorhídrico 0.04N	53
5.4-	Digestión con Bromuro de Cianógeno en Acido Clorhídrico 0.06N	53
5.5-	Digestión con Bromuro de Cianógeno en Acido Fórmico 70%	53
6-	Digestiones Enzimáticas	54
6.1-	Digestión con Tripsina	54
6.2-	Digestión con Quimotripsina	55
6.3-	Digestión con Clostripain	55
7-	Isoelectroenfocado en Gel de Poliacrilamida (PAGE)	56
8-	Condiciones de Trabajo con ARN	57
8.1-	Obtención de ARN total: Método de ClCs/Isotiocianato de Guanidina	58
8.2-	Obtención de ARN-m: Cromatografía en Oligo(dT)-Celulosa	59
9-	Fraccionamiento de ARN-m en Gradiente de Sacarosa	61
10-	Traducción in Vitro de ARN-m en Lisados de Reticulocitos de Conejos	62
11-	Electroforesis en Gel de Agarosa al 1%	64
12-	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida en Dodecil Sulfato de Sodio (PAGE-SDS)	65
13-	Transferencia Electroforetica de Proteínas a Membranas de Nitrocelulosa (Western Blotting)	66

14-	Inmunodetección de Proteínas en Membranas de Nitrocelulosa	67
15-	Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) en Fase Reversa	70
16-	Enzimoimmunoensayo en Portaobjeto (SIA)	71
17-	Determinación de la Actividad Enzimática de Creatina Quinasa	72
18-	Determinación de la Concentración de Proteína	73

RESULTADOS

I-	Purificación de la Creatina Quinasa BB (CK-BB) de Cerebro de Rata Prepuber	74
II-	Comparación de la Movilidad Electroforética de la CK-EIP y la CK-BB	82
III-	Estudios Inmunológicos Comparativos de la Inmunoreactividad de la CK-EIP y la CK-BB	84
III.1-	Enzimoimmunoensayo en Portaobjeto (SIA)	84
III.2-	Inmunodifusión Bidimensional (Ouchterlony)	86
IV-	Comparación de Propiedades Químicas y Fisicoquímicas de la CK-EIP y la CK-BB	95
IV.1-	Isoelectroenfocado	95
IV.2-	Digestiones Químicas	98
IV.2.1-	Digestión con Acido Fórmico 88%	98
IV.2.2-	Digestión con Acido Clorhídrico y con Bromuro de Cianógeno en Acido Clorhídrico	101
IV.2.3-	Digestiones con HCOOH 70% y con Bromuro de Cianógeno en Acido Fórmico 70%	105
IV.3-	Digestiones Enzimáticas	109
IV.3.1-	Digestión con Tripsina	109
IV.3.2-	Digestión con Clostripain	109
IV.3.3-	Digestión con Quimotripsina	112

V-	Aislamiento del ARN-m de Creatina Quinasa (CK-EIP) Inducida por Estrógeno en Utero de Rata Prepúber	114
V.1-	Obtención de ARN-m	114
V.1.1-	Obtención de ARN-m poli A+ de Utero de Ratas Prepúberes	115
V.1.2-	Obtención de ARN-m poli A+ de Utero de Ratas Prepúberes Inducidas por Estrógeno	120
V.1.3-	Obtención de ARN-m de Utero de Ratas Adultas	120
V.2-	Traducción In Vitro de ARN-m poli A+ de Utero de Rata Prepúber, de Utero de Rata inducida con Estrógeno y de Utero de Rata Adulta	120
V.3-	Purificación del ARN-m de CK-EIP por Gradiente de Sacarosa	122

DISCUSION

A-	Comportamiento Cromatográfico y Movilidad Electroforética de la CK-EIP y la CK-BB	126
B-	Comparación de la Inmunoreactividad de la CK-EIP y la CK-BB	130
B.1-	Enzimoimmunoensayo en Portaobjeto (SIA)	131
B.2-	Inmunodifusión Bidimensional (Ouchterlony)	133
C-	Comparación del Punto Isoeléctrico de la CK-EIP y la CK-BB	135
D-	Comparación de las Digestiones Químicas de la CK-EIP y la CK-BB	136
E-	Comparación de las Digestiones Enzimáticas de la CK-EIP y la CK-BB	140
F-	¿Son la CK-EIP y la CK-BB la misma proteína?	143
G-	ARN-m de la CK-EIP	145

CONCLUSION 147

BIBLIOGRAFIA 152

Abreviaturas y Símbolos

A	Absorbancia
Act	Actividad
ADN	Acido Desoxiribonucleico
ADP	Adenosina 5'-Difosfato
Arg	Arginina
ARN	Acido Ribonucleico
ARN-m	ARN mensajero
ARN-r	ARN ribosomal
ARN-t	ARN de transferencia
ARN-m poli A+	ARN-m poliadenilado
Asn	Aspargina
Asp	Acido Aspártico
ATP	Adenosina 5'-Trifosfato
CK	Creatina Quinasa
CK-B	Subunidad B de Creatina Quinasa
CK-BB	Creatina Quinasa de Cerebro
CK-EIP	Creatina Quinasa Inducida por estrógeno
CK-M	Subunidad M de Creatina Quinasa
CK-MB	Isoenzima MB de Creatina Quinasa
CK-MM	Creatina Quinasa de Músculo
cm	Centímetros
cpm	Cuentas por minuto

DEAE	Dietilaminoetil
EDTA	Acido Etiléndiaminotetracético
esp	Específica
Fig	Figura
g	Gramos
G-6-P	D-Glucose-6-Fosfato
G-6-PDh	Glucose-6-Fosfato Deshidrogenasa
h	Hora
H	Cadena Pesada
HAU	Hidroxiapatita Ultrogel
HK	Hexoquinasa
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Presión
HTP	Hidroxiapatita
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
KIP	Proteína Intermediaria LLave
l	Litro
L	Cadena Liviana
Lys	Lisina
M	Molar
mA	Miliamperes
MAb	Anticuerpo Monoclonal
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar

NADP	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato(forma oxidada)
NADPH	NADP (forma reducida)
nm	Nanometros
PAGE-SDS	Gel de Electroforesis de Poliacrilamida en SDS
PAGIEF	Gel de Isoelectroenfocado en Poliacrilamida
PBS	Buffer Fosfato-Salino
p:p	Peso en peso
PrI	Proteína Inducida
Pro	Prolina
prot	Proteína
purif	Purificación
rpm	Revoluciones por Minuto
S	Unidad Sverdberg
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SIA	Enzimoimmunoensayo en Portaobjeto
seg	Segundos
TBS	Buffer Tris-Salino
TES	Buffer Tris-EDTA-Salino
TPBS	Buffer Fosfato-Salino-Tween 20
Tris	2-Amino-2(Hidroximetil)-1,3 Propanodiol
U	Unidades
v:v	Volumen en volumen
X	Aminoácido
ug	Microgramos
x	Porcentaje

PROLOGO

La proteína inducida (PrI) por estrógenos en útero de rata, descrita por Notides y Gorski en 1966, fue identificada por Reiss y Kaye en 1981 como una proteína con características similares a la Creatina Quinasa de cerebro de rata. Kumar y col. en 1983 purificaron por primera vez a la Creatina Quinasa inducida por estrógenos del útero de rata prepúber, órgano blanco de la hormona.

En esta Tesis Doctoral se presenta la purificación de la Creatina Quinasa de cerebro de rata prepúber y su comparación con la Creatina Quinasa inducida por estrógenos en útero de rata prepúber. Los estudios realizados de caracterización química e inmunológica revelan que estas proteínas no son idénticas.

Estos resultados llevan implícito el interrogante de la probable existencia de un gen correspondiente a la Creatina Quinasa inducida por estrógenos diferente del gen de la Creatina Quinasa de cerebro de rata o de la presencia de una única unidad transcripcional de la que provengan ambas proteínas por diferente procesamiento.

El haber logrado un enriquecimiento del Acido Ribonucleico mensajero de la Creatina Quinasa inducida por estrógenos en útero, como el disponer de anticuerpos específicos contra esta

proteína, abre las puertas para la obtención de una biblioteca de Acido Deoxiribonucleico copia y el rastreo inmunológico de su producto de expresión.

Ubicar a nivel genómico el gen de la Creatina Quinasa inducida por estrógenos permitirá realizar estudios en la región 5'. El hecho de que la Creatina Quinasa sea una proteína inducida tempranamente por acción de los estrógenos hacen altamente probable que los estudios realizados en la zona 5' del gen conduzcan a la obtención de la region de unión del complejo estrogeno-receptor al Acido Deoxiribonucleico. Por ello es importante considerar que la Creatina Quinasa inducida por estrógenos y la Creatina Quinasa de cerebro no, son la misma proteína y dilucidar cuál es él o los genes inducidos tempranamente por estrógenos en útero de rata.

INTRODUCCION

a- PrI: Potencial Marcador de la Acción Temprana de los Estrógenos

Descrita originalmente por Notides y Gorski (Ref. 1) en 1966 y llamada simplemente PrI, por proteína inducida, continua siendo un enigma con respecto a su función fisiológica.

La potencialidad de la PrI para dilucidar los mecanismos tempranos de la acción del complejo esteroide-receptor ha servido de estímulo en el constante esfuerzo de purificar y caracterizar esta proteína.

La PrI puede ser detectada in vivo (Ref. 2) o in vitro (Ref. 3) en utero de rata a los 40min de la administración de estrógeno. Su inducción sensible a actinomicina D (Ref. 4), depende de la síntesis de nuevo ARN-m que es detectable a los 15min post administración de la hormona. Esta ubicación temporal caracteriza a la PrI como una de las primeras proteínas inducidas por estrógeno. Su síntesis no parece depender en previa síntesis de proteína lo que sugiere que la PrI refleja un primer cambio a nivel de la expresión de genes inducida por estrógeno.

a.1- Ubicación e Importancia de la PrI en la Secuencia
Cronológica de Eventos Inducidos en Utero de Rata
por Acción de los Estrógenos

Los estudios realizados por Mueller y col. en la década del 50 sobre el mecanismo de acción de los estrógenos, demostraron que la administración de una única dosis de estradiol a ratas ovariectomizadas causaba, en útero, una rápida aceleración de las reacciones de síntesis que llevan a la acumulación de fosfolípidos, ácidos ribonucleicos y proteínas (Ref. 5-9). La aceleración temprana de las reacciones de síntesis causada por estrógeno fue correlacionada con el simultáneo aumento de la actividad de ciertas enzimas de dichos caminos anabólicos (Ref. 10,11). Estos resultados sugirieron la posibilidad de que las alteraciones metabólicas globales podrian resultar de un aumento en el nivel enzimático causado por estrógeno y llevó a infructuosos intentos de activar hipotéticas proenzimas (Ref. 12).

Mueller y col. demostraron mediante la administración in vivo de puromicina a ratas ovariectomizadas que la síntesis de proteínas en útero era inhibida casi por completo y que no se producía inhibición de la síntesis de fosfolípidos ni de la síntesis de ácidos ribonucleicos. Bajo las mismas condiciones la administración in vivo de puromicina a ratas ovariectomizadas e inducidas con estrógeno inhibió la temprana aceleración de la síntesis de fosfolípidos y ácidos ribonucleicos e impidió la

característica toma de H₂O con el correspondiente aumento del peso del útero resultado de la acción de estrógeno in vivo. Mueller y col. postularon que para dilucidar el mecanismo de acción de estrogénos se necesitaba tanto identificar la interacción molecular de la hormona con el receptor como elucidar el sistema que amplifica los efectos de dicha interacción y sugirieron que el proceso de síntesis de proteínas era el sistema amplificador y que la respuesta a los estrógenos era expresada a través de la producción de enzimas limitantes de los procesos anabólicos afectados (Ref. 12).

Durante la década del 50 se realizaron importantes investigaciones dirigidas al estudio de la síntesis proteica. Habiéndose demostrado que la síntesis de proteínas específicas dependía de la síntesis previa de nuevas especies de ARN (Ref. 13,14), que la actinomicina D bloqueaba la síntesis de ARN y habiéndose postulado la hipótesis del ARN mensajero (Ref. 19), Ui y Mueller demostraron que bajo condiciones en que la síntesis de ARN era bloqueada por actinomicina D, la temprana aceleración de la síntesis de fosfolípidos y proteínas así como la mayor parte de la toma de H₂O resultados de la acción de los estrógenos en útero, no ocurría y sugirieron que la aceleración de dichos procesos dependía de la información contenida en el nuevo ARN sintetizado (Ref. 13).

Los estudios realizados sobre la incorporación de [³²P]-ortofosfato a ARN en el útero de rata fueron llevados

a cabo por Gorski y Nicolette quienes observaron que la incorporación aumentaba marcadamente dentro de las 2hs después de la administración in vivo de 17 β -Estradiol y que la velocidad de incorporación difería considerablemente en las fracciones nuclear, mitocondrial, ribosomal y soluble (Ref. 21). La existencia de una enzima, ARN polimerasa, de núcleo de tejido de mamífero que sintetizaba ARN con el uso del ADN como templado y de los cuatro ribonucleótidos como sustrato (Ref. 22) podía explicar el efecto de los estrógenos en la síntesis de ARN en útero, Gorski caracterizó la ARN polimerasa en la fracción nuclear de útero de ratas prepúberes por su dependencia en la presencia de los cuatro nucleótidos y por su inhibición por actinomicina D y por pirofosfato. Las preparaciones nucleares de útero de ratas tratadas con estrógeno in vivo por una y dos horas mostraron un aumento en la actividad de la polimerasa con respecto a los controles no tratados con estrógeno, dicho aumento de actividad debido a la acción de los estrógenos se perdía cuando era aumentada la fuerza iónica del medio de incubación por el agregado de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (Ref. 23).

Estas observaciones y otras muchas realizadas sobre la ARN polimerasa de núcleo y sobre las especies de ARN sintetizado (Ref. 24-31) fueron aclaradas años más tarde, luego de la descripción de la ARN-polimerasas I y II (Ref. 32,33) y el uso de α -amanitina (Ref. 34) por Glasser y col. (Ref. 35) de cuyos resultados voy a referirme más adelante, luego de presentar la descripción de la 'proteína inducida' (PrI).

Los estudios realizados con inhibidores de la síntesis de proteínas permitieron comprender que la temprana respuesta metabólica a los estrógenos dependía de dicha síntesis. Noteboom y Gorski informaron que el aumento de la síntesis global de proteínas debida a la estimulación con estrógenos ocurría pasadas las dos horas de la administración de la hormona y que la administración de puromicina durante las dos horas después de la administración de estrógeno bloqueaba la síntesis de ARN y el aumento de la actividad de la ARN polimerasa. Si se asumía que la puromicina solamente inhibía la síntesis de proteína, entonces los estrógenos inducían la síntesis de algunas proteínas que en su momento podrían afectar la fracción nuclear y producir un aumento en la actividad de la ARN polimerasa (Ref. 36). Para reafirmar que estos efectos se debían a una inhibición de la síntesis de proteína, Gorski y col. demostraron que no había un efecto significativo en la síntesis global de proteína durante dos horas de bloqueo de la acción de estrógenos con cicloheximida y que el aumento de las síntesis de ARN y lípidos eran también bloqueados (Ref. 37).

Hasta ese momento la síntesis de proteína y de ARN habían sido implicadas en el mecanismo de acción de un número de hormonas, incluyendo los estrógenos, pero cual era de esos dos pasos la respuesta primaria a los estrógenos aún no estaba en claro. Los estudios realizados con inhibidores de la síntesis de proteínas, puromicina y cicloheximida, indicaron que la

expresión de la respuesta estrogénica de las células uterinas era dependiente de la síntesis de proteínas (Ref. 12,36,37). Dado que la síntesis global de proteínas no se producía hasta 2 a 4 hs después de la administración de la hormona (Ref. 36), mientras que un número de otras actividades metabólicas sufrían un aumento más temprano que era inhibido por inhibidores de la síntesis de proteínas (Ref. 37), Gorski y col. postularon que la acción temprana de los estrógenos induciría la síntesis de unas pocas proteínas uterinas específicas que no eran detectadas por su baja contribución al nivel de proteína.

La evidencia directa de la existencia de dichas proteínas fue obtenida por Notides y Gorski (Ref. 1) y confirmada por Barnes y Gorski (Ref. 2) que utilizaron la técnica de doble marcación isotópica de las proteínas de útero para demostrar la incorporación de aminoácidos marcados en un banda de proteína que llamaron "proteína inducida" (PrI), cuando proteínas solubles de útero de ratas eran analizadas por electroforesis en gel de almidón. La administración de una sola dosis de 17β -Estradiol a ratas prepúberes o a ratas adultas ovariectomizadas inducía la síntesis de novo de proteína soluble uterina específica. Este efecto de la hormona era detectable in vivo a los 45-60min de la administración de estrógeno.

DeAngelo y Gorski comunicaron en Abril de 1970 que la banda de proteína (PrI) inducida por estrógeno no era inhibida por puromicina ni por cicloheximida y era inhibida por un inhibidor

de la síntesis de ARN, actinomicina D. Era la primera información sobre una respuesta estrogénica no inhibida por inhibidores de la síntesis proteica. Esto indicaba que el paso sensible a actinomicina D que precede a la síntesis de la PrI era el evento primario en la acción de los estrógenos (Ref. 4).

Otras proteínas fueron investigadas en la búsqueda de marcadores que permitieran dilucidar los mecanismos tempranos de la acción de los estrógenos. Kaye y col. informaron sobre el aumento de la actividad específica de la Ornitina Decarboxilasa en útero de rata prepuber inyectadas con 17 β -Estradiol con un máximo a las 4hs de administrada la hormona, aumento que era bloqueado por puromicina y cicloheximida y sobre el aumento de la actividad específica de la S-Adenosilmetionina Decarboxilasa Putrescina dependiente que llegaba a un máximo a las 4hs del tratamiento con estradiol y luego se mantenía constante hasta la última determinación de su actividad a las 10hs del tratamiento con la hormona. Kaye y col. expresaron en dicho trabajo que, si bien de los datos obtenidos sobre la inhibición de enzimas por inhibidores de las síntesis de proteína y de ARN se infería que el estradiol estimulaba la síntesis de nueva proteína enzima y que la nueva síntesis de ARN-m podría ser necesaria para que ocurriese dicha estimulación, esas inferencias estarían sujetas a las limitaciones de la especificidad de la acción de la cicloheximida (Ref. 38) y en particular de la actinomicina D (Ref. 39) en los animales vivientes y sugirieron que la disponibilidad de un sistema de cultivo de tejido o de células

sería de gran ayuda para dilucidar si nueva proteína enzima era sintetizada luego del tratamiento con estradiol (Ref. 40).

Otra enzima investigada fue la ARN polimerasa, caracterizada como mencioné anteriormente, por Goraki en la fracción nuclear de útero de rata prepuber (Ref. 23). Otros investigadores caracterizaron las diferentes especies de ARN sintetizado, el ARN-r mostraba un aumento temprano en su síntesis, 30min despues de la administración de estrógeno; luego, a los 60min aumentaba el ARN-t y a los 120min el ARN tipo ADN (Ref. 25,29), sin embargo resultados obtenidos por Knowler y Smellie (Ref. 44) sugerían que ARN de alto peso molecular, que no era del tipo ribosomal, era sintetizado dentro de los 30min despues de inyectada la hormona y antes de que la síntesis de ARN-r fuese estimulada. Glasser y col., luego de la descripción de las ARN-polimerasas I y II hecha por Roeder y Rutter (Ref. 32,33), informaron el aumento en núcleos uterinos aislados, a los 10-15min de inyectada la hormona a ratas ovariectomizadas, de la actividad de la ARN-polimerasa II que estaba ubicada en nucleoplasma y sintetizaba ARN tipo ADN, dicha actividad alcanzaba un pico a los 30min y luego declinaba a los valores del control, entre 1-2hs, y luego mostraba un segundo aumento desde las 2 a las 12hs. La siguiente respuesta al estradiol fue un incremento a los 30-60min en la actividad de la ARN-polimerasa I (síntesis de ARN-r). El aumento a los 15min de la síntesis temprana de ARN era completamente eliminado por α -amanitina, un inhibidor de la ARN-polimerasa II. El aumento

temprano, a los 15min, de la actividad de la ARN-polimerasa II (síntesis de ARN tipo ADN) observado 15min después de la inyección con 17β -Estradiol, podría explicar el temprano incremento, a los 15-30min, en la síntesis de ARN nuclear in vivo en útero de ratas prepúberes (Ref. 27,28,39,40), la temprana síntesis de ARN informada por DeAngelo y Gorski (Ref. 4) y Wira y Baulieu (Ref. 41) y la temprana síntesis de ARN de alto peso molecular informada por Konwler y Smellie (Ref. 44). Esta actividad nucleoplasmática inducida podría también ser responsable por la síntesis de proteínas inducidas (entre ellas la PrI) en ratas prepúberes o adultas ovariectomizadas observada a los 30-45min después de la inyección de 17β -Estradiol (1,4,45,46). El aumento más tardío de la actividad de la ARN-polimerasa I (síntesis de ARN-r) era consistente con los informes de otros laboratorios (Ref. 23-25,27,28,30,32,36).

Baulieu y col. postularon que la síntesis de una proteína activadora que en su momento estimularía a la ARN polimerasa resistente a α -amanitina podía ser un paso decisivo y probablemente limitante de la acción de la hormona y llamó a dicha proteína 'proteína intermediaria llave' (KIP). KIP debería ser detectada antes o al mismo tiempo en que se producía el aumento de ARN polimerasa y consecuentemente, antes del aumento generalizado de la síntesis de proteína y debería depender de la síntesis de ARN-m sensible a α -amanitina. Hasta ese momento se conocía que después de la inyección de estradiol a ratas prepúberes o ratas adultas ovariectomizadas una

'proteína inducida' (PrI) era observada a los 30min (Ref. 1) y era suprimida por actinomicina D (Ref. 4,45,46), Wira y col. informaron que la PrI era detectada en citoplasma y en núcleo y que podía ser obtenida in vitro exponiendo los úteros de ratas prepúberes a estradiol 1nM por 60min y que su síntesis era suprimida por actinomicina D si esta era agregada a tiempo cero y solo se producía un bloqueo parcial si era agregada a los 15min después del Estradiol. La síntesis de la PrI era bloqueada por α_1 -amanitina. Se detectaba in vivo e in vitro la aparición de especies 15S de ARN (algunas veces acompañada por ARN 8S) usando una técnica de doble marcación y electroforesis en geles de poliacrilamida. Todas estas propiedades de la PrI y del temprano ARN-m observado eran compatibles con las características de la KIP y del ARN-m de la KIP, aunque no había todavía evidencias de que ambas, la PrI y la KIP, fueran idénticas (Ref. 43). Esta hipótesis fue luego descartada ya que la PrI no se encontraba en el núcleo (Ref. 126).

Katzenellenbogen y Gorski indujeron la síntesis de la PrI en útero de rata prepuber in vitro con concentraciones fisiológicas de estradiol agregado en el medio de incubación del tejido. Se producía la máxima inducción de la PrI y la máxima unión del [3 H]-Estradiol al receptor nuclear utilizando estradiol 2 a 3 x 10⁻⁸M. La respuesta obtenida in vitro con 2 x 10⁻⁸M fue alrededor del 85% de la obtenida in vivo. Las proteínas sintetizadas después de la inducción con estrógeno, in vivo o in vitro, coincidían cuando se las analizaba por

coelectroforesis en geles de poliacrilamida. El aumento de la capacidad de síntesis de la PrI era sensible a la actinomicina D tanto in vivo como in vitro. La inducción de la PrI mostró estricta especificidad hormonal, solamente compuestos estrogénicos con distinta eficacia de inducción: 17β -Estradiol > Dietilstilbestrol > Estriol > 17α -Estradiol pero no Progesterona, Testosterona ni Insulina indujeron la PrI en utero de rata. Quedaba claramente establecida la capacidad de los estrógenos para estimular el útero sin el requerimiento de los sistemas vascular o nervioso intactos (Ref. 3).

Los datos obtenidos por Katzenellenbogen y Gorski mostraban una correlación entre la cantidad de 17β -Estradiol unida al receptor nuclear y la velocidad de síntesis de la PrI, indicando que estos parámetros podrían estar relacionados (Ref. 3). Somjen y col. estudiaron la respuesta uterina de rata a una única inyección de 17β -Estradiol durante el desarrollo postnatal, con respecto a: 1- la unión de la hormona al núcleo, 2- la inducción de síntesis de proteína citoplasmática específica (PrI), 3- la velocidad de incorporación de [3 H]-aminoácidos a proteína total y a proteína ácida nuclear soluble e insoluble y 4- la velocidad de incorporación de [3 H]-Timidina a ADN. La unión específica de 17β -Estradiol al núcleo determinada por la técnica de intercambio (Ref. 47) podía ser demostrada inclusive al primer día de vida y la administración de la hormona in vivo causaba un aumento del número de sitios de unión en las ratas de 10 días o mayores.

Somjen y col. describieron un método rápido para la detección de la PrI, basado en electroforesis en acetato de celulosa. La inducción de la PrI pudo ser demostrada a la edad de 10, 15 y 20 días, y no fue detectada en ratas de 5 días de vida. La incorporación de aminoácidos marcados a proteína total así como a proteína nuclear ácido-soluble y a proteína nuclear ácido-insoluble podían ser estimuladas por estradiol en el útero de rata de 15 a 30 días pero no de 5 a 10 días de vida. En útero de ratas de 20 días la mayor velocidad de síntesis de ADN ocurría a las 24hs después de la administración de la hormona. La capacidad de unión del núcleo al estradiol y la síntesis de la PrI eran demostrables en el útero de rata antes de que éste adquiriese la habilidad de responder a la hormona con el aumento global de síntesis de proteína y de ADN, esto sugirió que la unión al núcleo y la síntesis de la PrI podrían ser condiciones necesarias pero no suficientes para la acción trófica del estradiol (Ref. 48).

Los datos obtenidos por Katzenellenbogen y Gorski demostraron que la síntesis de la PrI en útero de rata prepúber, in vitro, era máxima cuando la unión del estradiol al núcleo era también máxima (Ref. 3). Similares observaciones fueron realizadas por Iacobelli estudiando la respuesta del útero de ratas ovariectomizadas tratadas con estrógeno. Las fluctuaciones cíclicas de síntesis de la PrI y de la cantidad de estradiol unido al núcleo de las células uterinas a lo largo del ciclo menstrual, se correlacionaba con la velocidad de secreción

de estrógeno. La pequeña cantidad de la PrI y de estrógeno unido al núcleo durante metaestro y estro se correlacionaba con la mínima velocidad de secreción de estrógeno. Durante el diestro, la velocidad de secreción de estrógeno aumentaba junto con un aumento de síntesis de la PrI y un aumento de unión de estrógeno al núcleo con valores mayores que los presentados durante metaestro y estro. La máxima síntesis de la PrI y la máxima cantidad de unión de la hormona al núcleo ocurría durante el proestro y coincidía con el pico de secreción de estrógeno. Esto sugería que las fluctuaciones de síntesis de la PrI y de la unión de estrógeno al núcleo estaban bajo el control de los estrógenos del ovario. El peso uterino, el contenido proteico y la relación de proteína a ADN eran significativamente mayores en proestro que en metaestro o en estro, sugiriendo que las fluctuaciones en la síntesis de proteína ocurría durante el estro. Las máximas respuestas estrogénicas eran acompañadas por picos de síntesis de la PrI y de unión de estradiol al núcleo en las células uterinas en proestro. Si la relación entre el aumento de peso del útero, el aumento de la velocidad de síntesis de la PrI y la máxima concentración de sitios de unión del estradiol durante el proestro era casual, quedaba por ser investigado (Ref. 49).

Katzenellenbogen, al igual que Iacobelli (Ref. 49) y con resultados semejantes, analizó la síntesis y la capacidad de inducción de la PrI en útero de rata adulta durante el ciclo menstrual. La síntesis de la PrI resultó ser máxima en proestro

sintetizada a niveles detectables en estro y metaestro y su síntesis fue mínima en diestro. Al suministrar estrógenos exógenos la síntesis de la PrI en proestro registró cierto incremento, una leve inducción de su síntesis se detectó en estro y una máxima (tan grande como al inducir con estrógenos el útero de rata ovarioctomizada) en metaestro y diestro. La síntesis cíclica de la PrI durante el ciclo menstrual en la rata adulta y su perfil temporal de síntesis durante las fases ricas en estrógenos llevaron a sugerir que la PrI estaría regulada por la hormona y tendría un papel probablemente importante en el funcionamiento del útero maduro quedando por dilucidar su función tanto durante el ciclo menstrual como durante la diferenciación del útero inmaduro o la rediferenciación del útero adulto atrófico luego de la ovarioctomía (Ref. 50).

El útero como un órgano complejo formado por diferentes tejidos, fue estudiado sobre distintas fracciones celulares. Investigaciones en útero de ratón demostraron un aumento global de síntesis de proteínas, después de la estimulación con estrógenos, en la fracción celular del estroma y del epitelio y dicho efecto era más marcado en epitelio (Ref. 51,52). Katzenellenbogen y col. estudiaron la localización de la PrI en los tejidos de útero de rata en búsqueda de indicios que llevaran a descubrir su función. Los estudios en útero de rata prepúber y de rata adulta estimuladas con estrógeno indicaron que la PrI era sintetizada en endometrio y miometrio. Estudios

autoradiográficos mostraron que los estrógenos se unían en ambos tejidos en útero de rata adulta (Ref. 53) y en útero de rata prepúber (Ref. 54,55). Sin embargo la respuesta a los estrógenos en ambos tejidos parecía ser diferente. El estradiol estimulaba la síntesis de ADN y la mitosis en ambos tejidos en útero de rata prepúber (Ref. 56), en cambio en útero de rata adulta casi exclusivamente el endometrio sufría división ante el estímulo de la hormona (Ref. 57,58). Los estudios en la síntesis de la PrI indicaban que en términos de la respuesta temprana la acción de los estrógenos era la misma en el endometrio y el miometrio uterino lo que implicaba que la divergencia en la acción de los estrógenos podría ocurrir en algún momento luego de la síntesis de la PrI (Ref. 59).

Para el año 1975 la ubicación de la PrI en la secuencia cronológica de eventos inducidos por la acción de los estrógenos en útero de rata prepúber o de rata ovariectomizada estaba delineada y la importancia de la PrI para el estudio de los mecanismos de la acción temprana de los estrógenos era evidente (Ref. 60, Fig. 1).

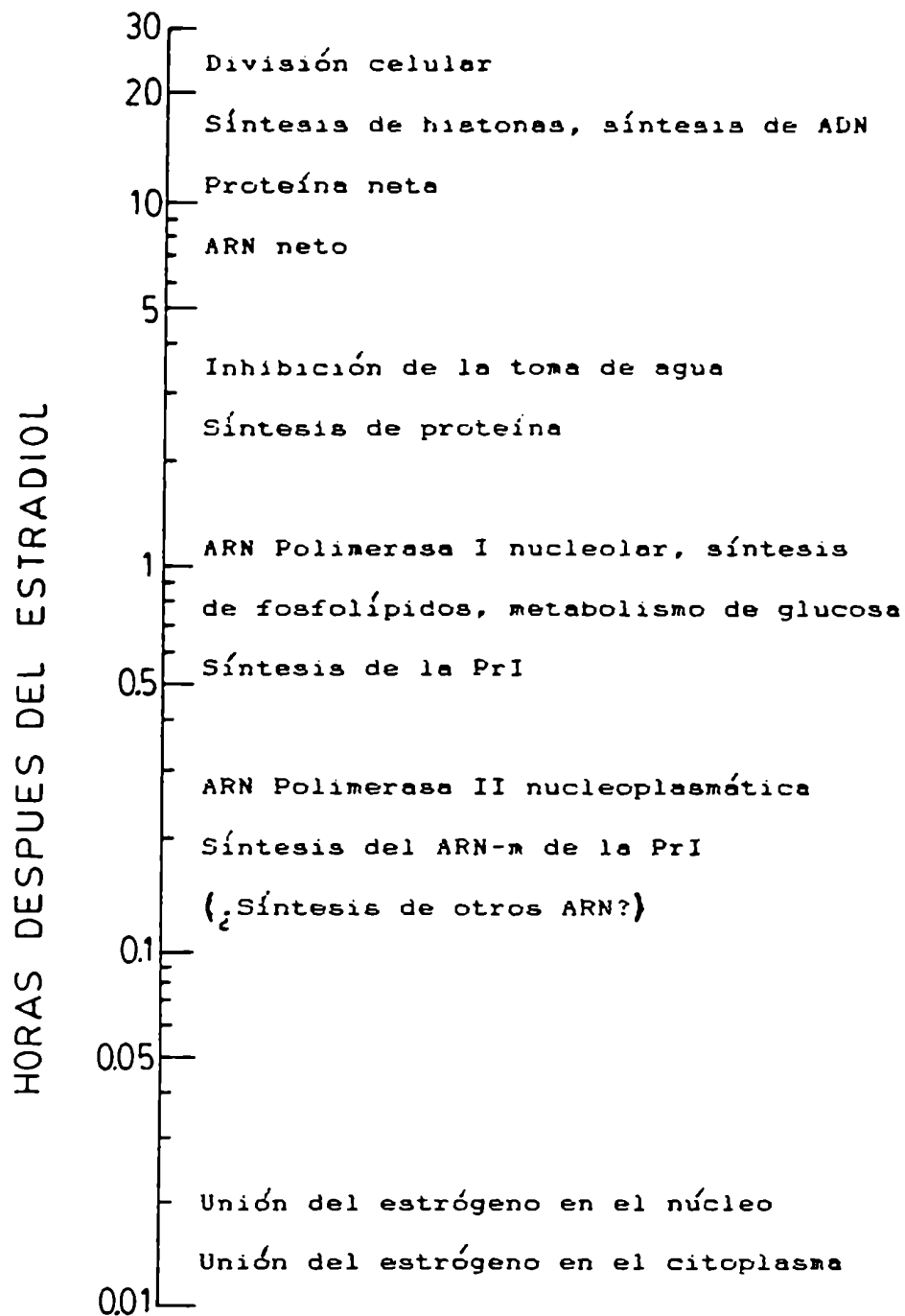


Fig. 1. Secuencias de eventos inducidos por 17 β -Estradiol en útero de rata prepúber u ovariectomizada luego de una inyección in vivo a tiempo cero. Las horas se indican en escala logarítmica (Katzenellenbogen y Gorski, Ref. 60)

a.2- La Síntesis de la PrI
en los Tejidos Uterinos

La respuesta del útero entero a los estrógenos representaba la respuesta neta de la reacción individual de los distintos tipos de células que forman el útero. Intentos para identificar las respuestas individuales de los diferentes tipos celulares que constituyen el epitelio, el estroma y el miometrio, variaron desde métodos in situ a métodos basados en la separación individual de los distintos tipos de células.

Los métodos in situ han sido histoquímicos (Ref. 61-65), y autoradiográficos (Ref. 53-55,66-68) y los métodos de separación física emplearon medios enzimáticos y mecánicos. Los métodos mecánicos incluyeron la disgregación (Ref. 69), el raspado (Ref. 70-72), corte (Ref. 52,73), disección (Ref. 74-78) y uso de instrumentos de cirugía (Ref. 79,80) para lograr la disrupción del tejido. Los métodos enzimáticos se basaron en el uso de tripsina (Ref. 81,82), colagenasa (Ref. 83-86), pronasa (Ref. 87) y hialuronidasa (Ref. 88-90), en forma individual y en una variedad de combinaciones. Los métodos in situ han aportado información sobre el orden en el que los distintos tipos de células responden a la estimulación estrogénica, especialmente con respecto a la división celular, estando limitados en cuanto a la oportunidad de la investigación bioquímica o del control de los eventos que ocurren in vivo. Las técnicas de separación física también tienen limitaciones,

principalmente relacionadas con la completa separación y las condiciones de separación de las células (Ref. 59). Excepto por los métodos de Smith y col. (Ref. 52), la mayoría de las técnicas de separación física no separan el epitelio del estroma sino que los remueven juntos como endometrio. En algunos estudios la habilidad de las células separadas para incorporar precursores radioactivos a proteínas (Ref. 52,73,87), para producir $^{14}\text{CO}_2$ a partir de [U- ^{14}C]-Glucosa (Ref. 83,87) y para excluir el colorante nigrosina (Ref. 83,84,87) eran tomadas como evidencias de la condición de viabilidad de las células por lo menos para un tiempo corto de incubación (5 a 10hs). También las concentraciones de Na^+ , K^+ , Cl^- y H_2O podían ser monitoreadas (Ref. 83). Dos trabajos concernientes a la deciduización en la rata (Ref. 81,82) aportaron evidencias sobre la estabilidad de las células uterinas después de la tripsinización.

Se han realizado estudios sobre la síntesis de proteínas inducidas por estrógeno en células uterinas de rata separadas y mantenidas en cultivo primario (Ref. 91,92), sin embargo era difícil mantener una población pura de cada uno de los diferentes tipos celulares uterinos en cultivo y más aún de mantener el nivel del receptor de estrógeno en las células en cultivo, necesario para obtener la respuesta estrogénica (Ref. 93-96). Además se obtuvieron evidencias en otros sistemas de respuestas a hormonas de la existencia de otros factores derivados del estroma que influyen la respuesta a la hormona

en el epitelio adyacente (Ref. 97).

Mairesse y Galand informaron que la síntesis de la PrI ocurría en los tres tejidos uterinos de rata, epitelio, estroma y miometrio, separados siguiendo una modificación del procedimiento de Smith y col. (Ref. 52), en respuesta a la administración de estrógeno a ratas ovariectomizadas (Ref. 98), ampliando y confirmando los datos obtenidos anteriormente por ellos mismos (Ref. 99) y por Katzenellenbogen y col. (Ref. 59).

Kuivanen y DeSombre estudiaron el efecto de la administración secuencial de 17β -Estradiol in vivo en la incorporación in vitro de $[^{35}\text{S}]$ -L-Metionina a proteínas específicas en el útero de rata prepúber e informaron sobre proteínas estimuladas en las distintas fracciones separadas, epitelio luminal y estroma-miometrio, pero en relación a la respuesta tardía a la acción de los estrógenos (Ref. 100).

La PrI seguía siendo la proteína con mayor potencial para el estudio de la acción temprana de los estrógenos en útero.

a.3- Otras Proteínas como Potenciales Marcadores de la Acción Temprana de los Estrógenos

Varias proteínas fueron estudiadas para ser usadas como marcadores de la acción estrogénica: el receptor de Estrógeno (Ref. 101), el receptor de Progesterona (Ref. 102), la Hidrolasa (Ref. 103-105), la Glucosa-6-Fosfatasa Dehidrogenasa (Ref. 106), la Ornitina Decarboxilasa (Ref. 40), la Peroxidasa (Ref. 107,108) y en los últimos años el activador tisular del Plasminógeno (Ref. 109-110). Los estudios realizados sobre estas proteínas se han basado en ensayos bioquímicos de sus actividades enzimáticas en lugar de en la determinación de síntesis de proteína de novo. La actividad enzimática podía correlacionarse con la síntesis de novo de ciertas enzimas pero el aumento de la actividad de ciertas enzimas en el útero no era el resultado de la síntesis de novo de proteínas. Por ejemplo el aumento de la actividad de Peroxidasa en útero después de la administración de estrógeno era debida primordialmente a la eosinofilia uterina con el consecuente aumento de la actividad de Peroxidasa (Ref. 111,112). En este caso el aumento de la actividad enzimática era un efecto de la respuesta estrogénica independiente de la activación genómica (Ref. 113-115).

Para estudiar el efecto de los estrógenos en la síntesis de novo de proteínas específicas, un número de investigadores analizaron la síntesis de proteínas en homogenato de utero utilizando doble marcación isotópica (Ref. 45,48,116-119) y

electroforesis en una dimensión (Ref. 45,48,100,116-120), dos dimensiones (ref. 91-121) o tres dimensiones (Ref. 122). Sin embargo muchos de ellos no detectaron cambios significativos en la síntesis de novo de proteínas específicas que no fueran la PrI.

La PrI era la proteína indicada para el estudio de los mecanismos tempranos de acción de los estrógenos en útero.

a.4- Purificación y Caracterización de la PrI y del ARN-m de la PrI

La PrI constituye una pequeña proporción de las proteínas totales de útero y para su identificación se utilizaba el método de doble marcación isotópica, aplicado por primera vez a las proteínas solubles de útero de ratas prepúberes, por Barnea y Gorski. Se agregaba $[^3\text{H}]$ -L-Leucina o $[^{14}\text{C}]$ -L-Leucina en el medio de cultivo donde se incubaban los úteros. Los úteros de las ratas controles se incubaban con uno de los isótopos y los úteros de las ratas inducidas con estrógeno se incubaban con el otro. Al final del período de incubación se mezclaban, homogeneizaban y centrifugaban y el sobrenadante era analizado por electroforesis en gel de almidón. El análisis del perfil electroforético usando la relación de proteínas de los úteros de ratas inducidas por estrógeno a incorporación de la marcación a las proteínas de los úteros de ratas controles se mantenía constante a lo largo de todo el perfil electroforético salvo en una posición determinada del gel donde se producía un aumento de la relación debido a la incorporación de la marca a proteína inducida por estrógeno. Dicha banda proteica se llamo PrI (Ref. 1,2).

En la búsqueda de la función fisiológica de la PrI, Katzenellenbogen y col. observaron que la PrI y la Ovalbumina presentaban semejanzas en cuanto a la velocidad de migración en

electroforesis en geles, en el comportamiento en los procedimientos de separación de proteínas y en su inducción de síntesis por estrógeno. Si la PrI y la Ovalbumina estuviesen relacionadas podría ser inferida una función fisiológica de la PrI y tener implicancias evolutivas. Sobre estas bases, propiedades físicas e inmunológicas de una proteína inducida por estrógenos en oviducto de pollo (Ovalbumina) y una proteína inducida por estrógenos en útero de rata (PrI) fueron comparadas. La movilidad electrofóretica en PAGE-SDS y el comportamiento en la elución cromatográfica en Sephadex G-100 indicaron que la PrI tenía un peso molecular aproximado de 42000, similar al de Ovalbumina y que presentaba una sola unidad polipeptídica. El punto isoelectrico de ambas proteínas fue de 4.6, además la PrI mostro un componente con punto isoelectrico 5.1. Pese a las similitudes encontradas, no hubo reactividad cruzada entre ambas proteínas lo que implicaba que eran inmunológicamente diferentes (Ref. 123).

Voaker y col. analizaron preparaciones parcialmente purificadas de la PrI, en relación a diferentes actividades enzimáticas. Dichas preparaciones no presentaban actividad de Adenilato o Guanilato Ciclasa, ni de Proteína Quinasa sino que presentaban actividad de Fosfoproteína Fosfatasa (Ref. 85). En realidad la PrI no presentaba tal actividad, Kaye y col. pudieron separar dicho contaminante mediante fraccionamiento del citosol de utero con $SO_4(NH_4)_2$. Además la actividad específica de Fosfoproteína Fosfatasa presente en el citosol de

útero permanecía inalterable 1, 4, 12 o 24hs después de la administración de estrógeno. La falta de fosforilación de la PrI en si misma (Ref. 124) hacia incompatible que la misma mediara la acción estrogénica en virtud de una actividad de Fosfoproteína Fosfatasa (Ref. 125).

En la búsqueda de una rápida identificación de la PrI, Somjen y col. emplearon el método de doble marcación isotópica, mezcla y homogenización de los úteros y centrifugación a semejanza del empleado por Barnea y Gorski (Ref. 2) pero analizaron el sobrenadante por electroforesis en celogel ubicando a la PrI en una banda de movilidad electroforética 1.1 veces mayor que la de Albúmina Sérica Bovina (Ref. 48). King y col. eluyendo del celogel la banda de la PrI y sometiendo dicha elución a PAGE-SDS y a isoelectroenfocado determinaron que la PrI tenía un peso molecular de 39000 y un punto isoelectrico de 4.5 y sugirieron que estaba compuesta por una única subunidad (Ref. 126).

Iacobelli y col. purificaron la PrI utilizando la doble marcación isotópica, cromatografía en DEAE-Celulosa y electroforesis en acetato de celulosa de donde eluían la banda de la PrI. Dicha preparación mostraba en PAGE-SDS una banda mayor de peso molecular 43000 y dos bandas menores de 88000 y 26000 (Ref. 127).

El uso de la doble marcación isotópica hacía difícil la

interpretación cuantitativa de los resultados (Ref. 128) y presentaba la desventaja de que la PrI solo podía ser medida después del tratamiento con estrógeno lo que hacía imposible determinar si estaba presente en el tejido sin inducir o en tejidos que no respondieran a la hormona. Walker y col. utilizaron [³⁵S]-Metionina en el medio de incubación de los úteros de ratas controles y de los úteros de ratas inducidas con 17β-Estradiol, los homogeneizaban por separado, sometían los sobrenadantes de la centrifugación a PAGE-SDS y analizaban por fluorografía el perfil electroforético obtenido. La diferencia observada entre los perfiles autoradiográficos provenientes del citosol de útero de las ratas control y del citosol de útero de las ratas inducidas por 17β-Estradiol era el aumento de la intensidad de una banda ubicada entre Tubulina y Actina, con un peso molecular aparente de 46000, que identificaron con la PrI (Ref. 129).

Walker y col. analizaron homogenatos de diferentes órganos de ratas prepúberes mediante electroforesis en celogel del sobrenadante de los homogenatos, la banda correspondiente a la movilidad electroforética de la PrI (1.05 a 1.02 veces mayor que la de Albúmina Sérica Bovina) era eluída del celogel y sometida a PAGE-SDS. Una banda de peso molecular 46000 (peso molecular de la PrI), fue detectada por tinción del gel con Coomassie Brilliant Blue en los casos del análisis de los homogenatos provenientes de corteza cerebral, hipotálamo y pituitaria de ratas prepúberes hembras así como de corteza cerebral de ratas

prepúberes machos. Los autores llamaron a esta banda 'proteínas semejantes a la PrI' y compararon dichas proteínas con la PrI mediante PAGE-SDS de la digestión de dichas bandas con *Estafilococo Aureus* Proteasa. De esta manera identificaron a la PrI como una proteína mayoritaria constitutiva en útero, pituitaria, hipotalamo y corteza cerebral de rata prepuber y sugirieron que el cerebro podia ser una fuente conveniente de material para su purificación en gran escala (Ref. 130).

El hecho de que el cerebro fuese la fuente mas rica en la PrI llevo a Kaye y col. a purificarla mediante la preparación de citosol de cerebro de ratas al que le agregaban una pequeña cantidad del citosol de útero de ratas inducidas con estrógeno y marcadas in vitro con $[^{35}\text{S}]$ -Metionina lo que permitía la visualización fluorográfica de la PrI y utilizaron precipitación con SO_4NH_4 , cromatografía en DEAE-Celulosa y PAGE-SDS preparativo, obteniendo un producto 85% puro de peso molecular 48000-50000 (Ref. 131,132). Como la PrI era una de las mayores proteínas solubles de cerebro, Kaye y col. buscaron en la literatura por proteínas con características fisicoquímicas semejantes a la PrI y encontraron que una proteína de cerebro llamada antígeno 14-3-2 (Ref. 133) y que presentaba actividad de Enolasa (2-Fosfo-D-Glicerato Hidrolasa, Ref. 134) podía estar relacionada con la PrI. La isoenzima acida ($\gamma\gamma$) de la Enolasa estaba presente en útero y respondía a estradiol, aumentando en utero y disminuyendo en cerebro despues de la administracion de la hormona. La actividad de Enolasa eluía de

la DEAE-Celulosa junto con la PrI (Ref. 132). Reiss y Kaye en su búsqueda bibliográfica encontraron en los trabajos de Wood que Creatina Quinasa (CK) y Enolasa YY de cerebro de rata copurificaban en DEAE-Celulosa, presentaban igual peso molecular y eran separadas en una columna de agarosa (Ref. 135,136). Agregar dicho paso de purificación a su protocolo les permitió identificar a la isoenzima BB de CK como el mayor componente de la PrI, en base a su actividad enzimática específica, su comportamiento cromatográfico y su inmunoprecipitación con antisuero contra la CK-BB. La identidad de ambas proteínas fue confirmada por análisis de doble marcación isotópica, comparación del perfil de las digestiones parciales con proteasas y el aumento de la síntesis de CK en respuesta a la administración de 17β -Estradiol. La relación molar de Enolasa YY a CK-BB en útero era de 1:300 (Ref. 137).

Walker y Kaye obtuvieron el ARN-m de útero y de cerebro de ratas prepúberes y lo tradujeron en un lisado de reticulocitos de conejo. Analizaron los productos de la traducción por: 1) inmunoprecipitación con anticuerpos contra la PrI purificada de cerebro, 2) electroforesis en dos dimensiones y 3) por digestión parcial con proteasa de las bandas seleccionadas de los geles monodimensionales o de las manchas seleccionadas del gel bidimensional. Estos análisis mostraron que el ARN-m de la PrI de útero o de cerebro eran fielmente traducidos en ese sistema de traducción libre de células. La comparación de los productos

de traducción provenientes de ARN-m de útero de ratas prepúberes controles y de ratas prepúberes inducidas con estrógeno por 1h reveló un aumento de la síntesis de la PrI. El aumento provenía por lo menos parcialmente de un incremento de la concentración uterina de ARN-m de la PrI (Ref. 143).

Kaye informó sobre la inserción en *E. coli* de ADN doble cadena preparado de una fracción enriquecida de ARN-m de cerebro utilizando técnicas convencionales de ingeniería genética. La hibridización de las colonias con ARN-m de útero de ratas controles y estimuladas con estrógeno reveló probables clones de CK-BB (Ref. 144).

Gorski y col. adoptaron el siguiente esquema de purificación de la PrI: partían de citosol obtenido de 400 úteros de ratas adultas mezclado con citosol (marcado in vitro con ^{14}C) de útero de 40 ratas prepúberes inducidas con estrógeno y citosol (marcado in vitro con ^3H) de útero de 40 ratas prepúberes controles. En PAGE-SDS del citosol, la PrI era difícilmente identificada ya que su peso molecular era similar a otras de las muchas proteínas citosólicas y un cambio en la relación de la incorporación de los isótopos era enmascarado por la gran cantidad de radioactividad que comigraba con la PrI. A medida que la PrI iba siendo purificada la banda correspondiente en PAGE-SDS se hacía mas notoria con la tinción con Coomassie Brilliant Blue y la relación $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ se hacia mayor con respecto a la misma relación de las otras proteínas citosólicas.

Utilizaron cromatografía en DEAE-Celulosa, Hidroxiapatita, tamiz molecular y electroforesis preparativa. La PrI presentaba en PAGE-SDS una banda principal de peso molecular 42000-45000 y una banda menor de peso molecular 80000 que por las características de interconvertirse dependiendo de la temperatura aplicada a la muestra antes de sembrar en el gel, podía ser un dímero de la PrI o la PrI unida a otra proteína de similar peso y tamaño (Ref. 138).

En 1983 Kumar y col. informaron por primera vez sobre la purificación de la PrI a homogeneidad del útero de rata prepúber, órgano blanco de la hormona. Brevemente, 50 ratas prepúberes fueron inyectadas intraperitonealmente con 5ug de 17β -Estradiol en 0.3ml de solución salina 1x en Etanol y otras 50 fueron inyectadas con la solución vehículo solamente. Luego de 1 a 1.5hs los animales fueron sacrificados y los úteros removidos y colocados en viales con medio de cultivo adicionados con $[^3H]$ -Leucina en el caso de los úteros de ratas tratadas con estrógeno y $[^{14}C]$ -Leucina en el caso de los úteros controles. Luego de 2hs de incubación los dos grupos de úteros se mezclaron, homogeneizaron, centrifugaron y el sobrenadante (citosol) fue cromatografiado en DEAE-Sephacel y luego en Hidroxiapatita Ultrogel siguiendo la purificación por el aumento en la relación $H^3/^{14}C$ y por la actividad de CK. Se obtenían 50ug de la PrI de los 100 úteros de rata prepúber, con una actividad específica de 2480u/mg de proteína, habiéndose

logrado una purificación de 1127 veces. La PrI presentaba en PAGE-SDS un peso molecular de 49000 y en isoelectroenfocado un punto isoelectrico de 5.2. La PrI purificada a homogeneidad de útero de ratas prepúberas se utilizaría para la obtención de anticuerpos de gran confiabilidad para el aislamiento del ARN-m de la PrI y la subsecuente producción de pruebas específicas (Ref. 139, Fig. 2: Purificación de la PrI por cromatografía en DEAE-Sephacel y en HAU, Fig. 3: PAGE-SDS de los sucesivos pasos de purificación de la PrI.)

Kumar y col. prepararon anticuerpos monoclonales contra la proteína CK inducida por estrógenos en útero de rata prepúber: CK-EIP. Dos de ellos, el MAb-28 y el MAb-78, ambos del tipo IgM, reaccionaban con la CK-EIP desnaturalizada pero no con la enzima nativa. El MAb-28 reaccionaba con la CK-BB de otras especies pero no con otras CK-MM, mientras que el MAb-78 reaccionaba con ambas isoenzimas de CK. La CK-EIP purificada de útero de rata prepúber como describí mas arriba (Ref. 139) y la CK-BB purificada de cerebro de rata prepúber como se indica en Resultados I de esta Tesis Doctoral, presentaron diferencias de reactividad frente al MAb-28, la reactividad de la CK-BB era menor que la de la CK-EIP indicando que o bien la CK-BB expresaba menos copias que la CK-EIP del determinante reconocido por el monoclonal o que la CK-BB poseía un determinante que reaccionaba con el anticuerpo con menor afinidad. Como los anticuerpos preferían los antígenos desnaturalizados era probable que la diferencia observada se debiese a una pequena

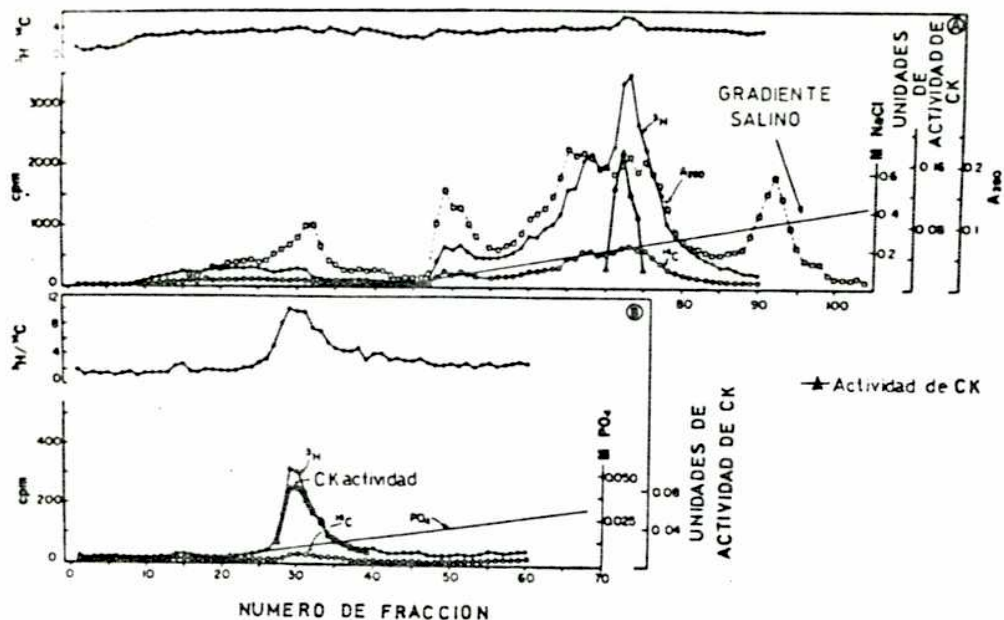


Fig. 2. Purificación de la PrI de útero de rata prepúber por cromatografía en (A) DEAE-Sephacel y en (B) Hidroxiapatita Ultrogel. (A) Citosol dializado, diluido a una concentración de proteína de 0.2mg/ml fue corrido en una columna de DEAE-Sephacel (1.5 x 30-cm) equilibrada con buffer Tris.Cl 0.01M, EDTA 1.5mM, pH7.6, con una velocidad de flujo de 30ml/h. La elución se llevó a cabo con un gradiente lineal (0 a 0.1M, volumen total 600ml). (B) Las fracciones Nro. 60 a 70 de la columna de DEAE-Sephacel, que presentaron un aumento de la relación $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ fueron mezcladas, dializadas contra EDTA 1.5mM, pH7.0, y corridas en una columna de Hidroxiapatita Ultrogel (1.5 x 30-cm) equilibrada con EDTA 1.5mM, pH7.0. Se eluyó con un gradiente lineal de 0 a 0.1M de buffer Fosfato pH6.8 (Ref. 139).

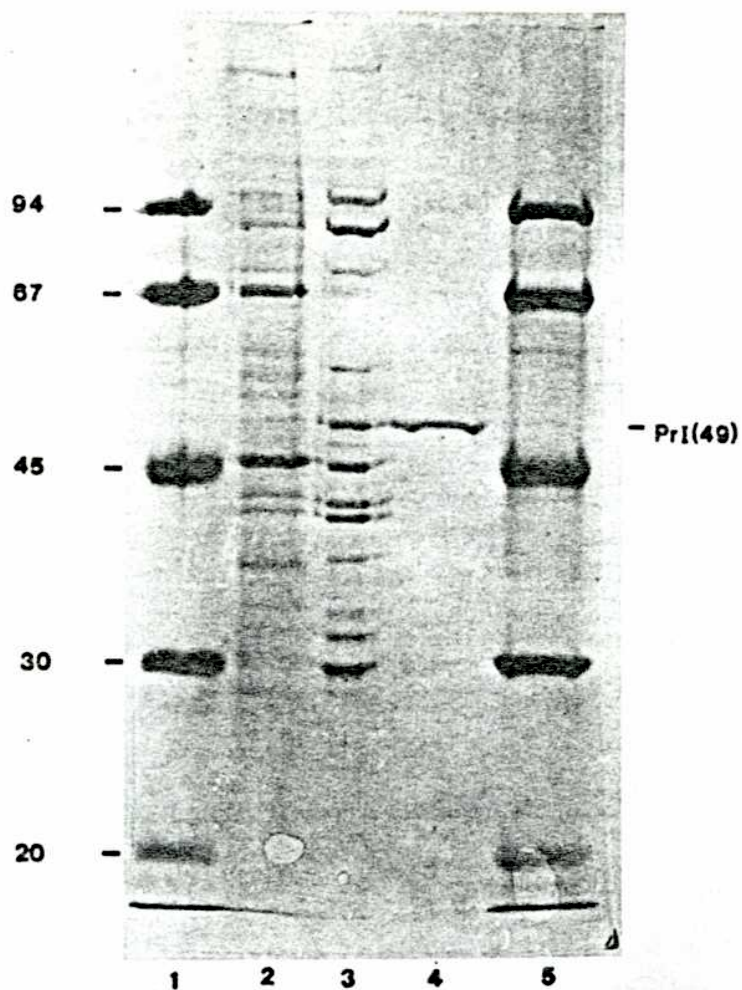


Fig. 3. Análisis en PAGE-SDS de las fracciones de la purificación de la PrI de utero de rata prepuber. Canal 1 y 5, marcadores de peso molecular (Fosforilasa b, 94000; Albúmina Sérica, 67000; Ovoalbúmina, 45000; Anhidrasa Carbónica, 30000; Inhibidor de la Tripsina de poroto de soja, 20000). Canal 2, Citosol. Canal 3, mezcla de las fracciones 60-70 eluídas de la columna de DEAE-Sephacel (ver Fig. 2A). Canal 4, mezcla de las fracciones 28-32 de la columna de Hidroxiapatita Ultrogel (ver Fig. 2B). El gel fue teñido con Coomasie Brilliant Blue (Ref. 139).

variación de la estructura primaria en el determinante aunque variaciones menores como la conversión de aspargina y glutamina a sus respectivos ácidos podía ocurrir durante el proceso de extracción y purificación de las enzimas y causar esa diferencia de reactividad con el anticuerpo. Los anticuerpos monoclonales deberían ayudar a dilucidar la relación de estructura y función de la CK-BB y la CK-EIP, la distribución anatómica de ambas y las variaciones fisiológicas, patológicas y experimentales en relación a la expresión de genes inducida por hormonas sexuales (Ref. 140, Fig. 4: Datos sobre las dos líneas híbridas estudiadas, Fig. 5: Reactividad (por SIA) de diferentes concentraciones de CK-EIP con el MAb-28, con el MAb-78 y con un monoclonal no relacionado.)

Experimento de fusión	Placa	Cultivo maestro	Número de clonados	Clon estudiado	Designación de la línea celular
1	b	3-71b	2	28	3-71b/25/49/28
2	c	4-50c	2	78	4-50c/8/82/78

Fig. 4. Datos sobre dos líneas celulares híbridas productoras de Anticuerpos Monoclonales contra la CK-EIP (Ref. 140).

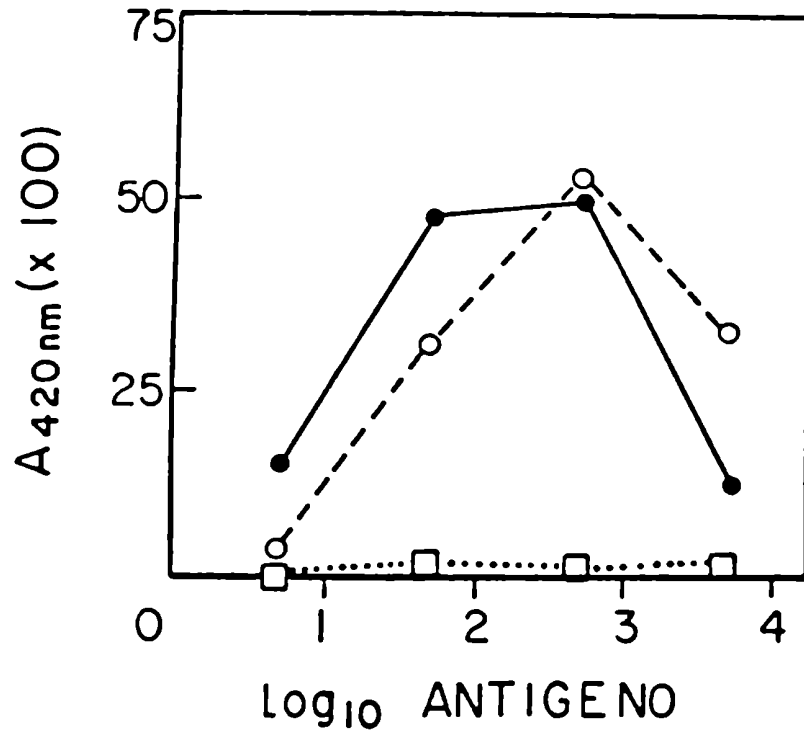


Fig. 5. Análisis por SIA de la inmunoreactividad de Anticuerpos Monoclonales contra la CK-EIP. (●) MAb-28 y (○) MAb-78 se unen a un amplio rango de concentraciones de la CK-EIP (ng/circulo, abcisa), mientras que un MAb no relacionado (□) con la CK-EIP no presenta unión. Líquido ascítico obtenido para ambas líneas productoras de MAb-28 y MAb-78 fueron ensayadas a una dilución de 1:100 por SIA. Las lecturas se realizaron a A₄₅₀ a los 15min de la adición del sustrato de la enzima.

b- Creatina Quinasa

Lehmann encontró que la liberación de la Creatina durante la contracción muscular requería ADP como cofactor y propuso que la Creatina-P reaccionaba con ADP para producir ATP y Creatina (Ref. 145).

En 1964 Burger y col. describieron tres isoenzimas de la Creatina Quinasa (CK) separadas por electroforesis en gel de agar. La isoenzima tipo I fue encontrada en cerebro, la tipo III en músculo esquelético y la tipo II, de movilidad electroforética intermedia, en músculo liso y corazón (Ref. 146). Ese mismo año Jacobs y col. informaron sobre una cuarta isoenzima de la Creatina Quinasa, presente en mitocondrias aisladas de cerebro, corazón y músculo esquelético (Ref. 147).

Dance y Watts analizaron la composición aminoacídica de la Creatina Quinasa de músculo y observaron que luego de la digestión triptica de la enzima solo la mitad de los peptidos esperados estaban presentes, lo que sugirió que la CK era un dímero compuesto por subunidades similares (Ref. 148). Dawson y col. demostraron que la CK era un dímero y que las tres isoenzimas descritas por Burger y col. (Ref. 146) estaban compuestas por dos subunidades: la B encontrada en cerebro y la M encontrada en músculo. La isoenzima de la CK de cerebro se componía de dos subunidades B (CK-BB) y la isoenzima de músculo

de dos subunidades M (CK-MM). La otra isoenzima que correspondía al tipo II de Burger se componía de una subunidad M y una subunidad B (CK-MB) (Ref. 149). Las dos subunidades de la CK eran distinguibles inmunologicamente, por sus mapas de digestión peptídica y por su composición aminoacídica. Demostraron también que la asociación de las subunidades B y M ocurría in vitro (Ref. 150,151).

La actividad de la CK se encontraba en tejido adiposo (Ref. 152) y en tumores (Ref. 153). En general la enzima mitocondrial se encontraba en mitocondrias aisladas de corazón, músculo esquelético y cerebro. Además cada uno de estos tejidos se caracterizaba por tener una diferente distribución de las otras isoenzimas, en cerebro se hallaba la CK-BB, en músculo esquelético la CK-MM y en corazón principalmente la CK-MM y cantidades apreciables de la CK-MB y la CK-BB. El corazón de pollo era una excepción ya que contenía la isoenzima mitocondrial y la CK-BB.

Grace y Roberts informaron que el peso molecular de las dos subunidades era aproximadamente 41000 (Ref. 154) pero más tarde con el uso de PAGE-SDS para chequear la pureza de las preparaciones de las isoenzimas Perryman y col. observaron una banda proteica en el caso de la CK-BB y una en el caso de la CK-MM y dos bandas proteicas en el caso de la CK-MB. Reexaminaron los pesos moleculares de las isoenzimas purificadas de distintas especies determinando por PAGE-SDS que la subunidad

M tenía un peso molecular de 41000 en todas las especies testeadas, y que el peso molecular de la subunidad B difería con la especie, siendo de 44500 en la humana, 46000 en la canina, 44000 en el conejo y 49000 en el ratón. Las digestiones con Bromuro de Cianógeno de las subunidades M de las diferentes especies presentaba un perfil semejante en PAGE-SDS y las mismas digestiones de las subunidades B de las diferentes especies mostraban un perfil propio de cada una. La subunidad mitocondrial tenía un peso molecular idéntico a la subunidad M. La subunidad B parecía haberse conservado menos durante la evolución que la subunidad M (Ref. 155).

b.1- Las Isoenzimas de la Creatina Quinasa

La CK-MB ha sido estudiada en relación a su importancia clínica ya que la variación de su concentración normal en plasma humano es un marcador específico del infarto de miocardio (Ref.156) y consecuentemente la importancia de discernir entre un aumento de la CK-MB (infarto o enfermedad renal) o un aumento de la CK-BB (relacionado con enfermedades neoplásicas o cerebro-vasculares u otras) en plasma llevó a mejorar los métodos de separación y ensayo de ambas isoenzimas (Ref. 157-159).

La CK-MM, isoenzima específica de músculo, ocupa un rol importante en relación a su función en células diferenciadas. En el tejido embrionario se encuentra presente la CK-BB y en la

forma diferenciada del músculo esquelético se encuentra solamente la CK-MM. Durante cierto momento de la transición ambas subunidades están presentes y se unen para formar el heterodímero. Con el uso de una prueba de ADN obtenida de la subunidad M (pMCK₁) se obtuvieron evidencias de que en músculo esquelético embrionario como en mioblastos proliferativos en cultivo, no se encontraba presente el ARN-m correspondiente (Ref. 160), por lo tanto la transcripción de la CK-M era parte integral del programa que manejaba la célula diferenciada terminal de músculo esquelético. La pregunta central era si había alguna propiedad especial en la CK-MM no compartida con la CK-BB. Una diferencia importante entre ambas isoenzimas ha sido observada con respecto a la habilidad de unirse a las miofibrillas. La CK-MM ha sido identificada como uno de los componentes de la línea electrón-opaca que atraviesa el centro del sarcómero de miofibrillas y consiste en su mayor parte en los llamados puentes M (Ref. 161). Material removido de estos puentes presenta actividad de la Creatina Quinasa (Ref. 162). Algunos datos sugieren que la CK-MM unida a la línea M podría ser un sistema regenerante de ATP en la miofibrilla además de ser parte estructural del aparato contráctil (Ref. 160).

Un rol semejante ha sido asignado a la CK durante la mitosis ya que ha sido localizada por técnicas de inmunofluorescencia en los filamentos de las células en interfase (Ref. 163) y en el huso mitótico de células (de

líneas celulares en cultivo) en división, incluyendo la línea celular PtK₁ (Ref. 164,165) y ha sido encontrada en aislamientos de los husos de huevos de erizo de mar en división (Ref. 166) y de núcleos de células musculares en división. Cande demostró que la CK podía tener en la mitosis un rol semejante al observado durante la contracción del músculo esquelético (Ref. 167).

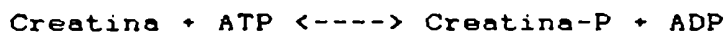
La CK-BB, isoenzima encontrada en tejido embrionario y en cerebro, había sido muy poco estudiada y nada se sabía sobre su regulación. Reiss y Kaye la identificaron con la PrI, proteína inducida por estrógenos en útero de rata (Ref. 131). Estudios preliminares de la inducción de la CK por estrógeno en tejidos normales y neoplásicos fueron realizados para analizar la posible regulación por estrógeno de otras enzimas del metabolismo energético y para evaluar la posibilidad de utilizar a la CK-BB como un marcador, en clínica, de la respuesta tumoral a la administración de estrógenos (Ref. 168). Kaye observó que los tejidos normales contenían predominantemente CK-BB y ésta era la isoenzima que se inducía in vitro en tejido de mama humano normal y que los tumores del tejido de mamas podían contener una proporción grande de la CK-MM (Ref. 168) mientras que otros tumores podían retener la CK-BB como enzima preponderante o exclusiva. Kaye sugirió entonces que el análisis de la composición de las isoenzimas de la CK en tumores y/o de la composición de las isoenzimas de la CK estimuladas por estrógeno en tumores de mama humano in vitro proveyería un mejor

marcador de la respuesta a la terapia endocrinológica (Ref. 144).

Kumar y col. confirmaron la asociación de la actividad de la CK con la PrI, aunque ciertas diferencias fueron observadas entre la PrI purificada de útero de rata prepúber inducida por estrógeno (Ref. 139) y la CK-BB purificada de cerebro de rata prepúber como se indica en Resultados I de esta Tesis Doctoral (Ref. 140, 141).

b.2- La Creatina Quinasa en el Transporte de Energía

La Creatina Quinasa cataliza la reacción reversible:



La Creatina es sintetizada en dos reacciones secuenciales enzimáticas a partir de Arginina y Glicina por transguanidación formando ácido guanidinoacético y posterior N-metilación para formar Creatina. Estas reacciones ocurren principalmente en hígado, páncreas y riñón. La cantidad de cada enzima presente en los diferentes tejidos difiere con las especies. Ninguna de las enzimas ha sido encontrada en músculo esquelético, corazón o cerebro, que son los tejidos donde se encuentran la Creatina y la Creatina-P en las más altas concentraciones. Ambas, Creatina y Creatina-P reaccionan no

enzimáticamente para formar la Creatinina que no es reconvertida a Creatina en cantidades apreciables. Por lo tanto estos tejidos deben mantener su reserva de Creatina a expensas de la Creatina plasmática. El interés en Creatina-P se basa en su función en el metabolismo energético.

La síntesis de la Creatina-P ocurre en mitocondria donde la Creatina Quinasa mitocondrial utiliza el nuevo ATP sintetizado para producir Creatina-P. La Creatina-P se utiliza para proveer ATP en las reacciones en que la célula lo necesite. Bessman y Carpenter propusieron una teoría muy interesante que postula que el uso de la Creatina-P en esas reacciones que requieren ATP involucraría una cercana asociación de la Creatina Quinasa a la ATPasa local lo que permitiría a la Creatina-P regenerar el ATP muy cerca del sitio activo de la ATPasa. Esto permite que la concentración efectiva de ATP cerca del sitio activo sea alta y por lo tanto que la reacción no sea limitada por la disponibilidad de energía (Ref. 169).

La presencia de Creatina Quinasa, Creatina y Creatina-P en altas concentraciones solamente en tres tejidos, corazón, músculo esquelético y cerebro, puede ser una pista sobre el origen evolucionario de este sistema de transporte de la energía (Ref. 169).

El rol de la CK-MM, como componente de los puentes M del sarcómero de miofibrillas (Ref.161) y la localización de CK en

los filamentos de células en interfase (Ref. 163) y en el huso mitótico (Ref. 164,165) ha sido claramente relacionado con el sistema regenerante de ATP (Ref. 160,167).

El rol de la CK-BB no está todavía tan delineado. El tejido cerebral no tiene presumiblemente mayor variación en la demanda de energía como ocurre en músculo y no requeriría este sistema de transporte de la Creatina para compensar la demanda. Probablemente el aporte continuo de energía en el cerebro sea tan crucial que un sistema de transporte de la Creatina-P no sea requerido para compensar variaciones en la demanda de energía sino para asegurar un suplemento energético bajo condiciones extremas como la anoxia (Ref.169).

o- Objetivos de esta Tesis Doctoral

Los objetivos del trabajo presentado en esta Tesis Doctoral fueron la identificación química e inmunológica de la proteína inducida por estrógenos en útero de rata prepúber (CK-EIP) que presenta actividad de Creatina Guinasa y su comparación con la Creatina Guinasa de cerebro de rata prepúber (CK-BB) que es una proteína mayoritaria de cerebro descrita como indistinguible de la CK-EIP. El ARN-m de la CK-EIP fue purificado de una preparación de ARN-m de útero de rata prepúber inducida por estrógeno, el futuro clonado de dicho ARN-m permitirá la deducción de la secuencia aminoacídica de la CK-EIP.

Se presenta en esta Tesis Doctoral:

- 1) la purificación de la CK-BB de cerebro de rata prepúber,
- 2) la comparación de la CK-EIP de útero de rata prepúber inducida por estrógeno y de la CK-BB de cerebro de rata prepúber mediante estudios inmunológicos y fisicoquímicos y
- 3) la purificación del ARN-m de la CK-EIP (Ref. 141,142).

MATERIALES y METODOS

1- Purificación de CK-BB de Cerebro de Rata

1.1- Obtención del Homogenato Inicial

Se utilizaron ratas Wistar, hembras prepúberes de 18 a 21 días de vida, obtenidas de Griffin Laboratory, Wadsworth Center for Laboratories & Research, Albany, NY. Los animales se sacrificaron por dislocación cervical y los cerebros se extrajeron e inmediatamente se congelaron en nitrógeno líquido. Luego de registrar su peso fueron molidos en una licuadora previamente enfriada y homogeneizados en un homogenizador de tejidos (Polytron) utilizando 5 veces pulsos en posición 6, de 15seg cada uno, con intervalos de 1min, a 0-4°C en un volumen 2.5 veces el peso de los cerebros de buffer Tris.Cl 10mM, EDTA 1.5mM, 2-Mercaptoetanol 5mM, con 40ul de aprotinin por ml de buffer, pH7.5. El homogenato fue centrifugado a 25000rpm por 150min a 4°C, en un rotor Beckman SW27.1.

En el sobrenadante del Homogenato Inicial, se cuantificó la enzima CK (ver 16) y se lo utilizó para la purificación de la misma.

1.2- Cromatografía en Columna

En todos los casos en que se utilizó cromatografía en columna los siguientes parámetros fueron medidos en el material sembrado y en las fracciones eluidas:

- Actividad de CK (ver 17)
- Proteínas por el método de Bradford (ver 18)
- Absorbancia a 280 y 260nm.
- Conductividad

Las alícuotas de las fracciones pertinentes fueron conservadas a -80°C para su posterior análisis en PAGE-SDS (ver 12)

1.2.1- Cromatografía de Intercambio Iónico en DEAE-Sephacel

DEAE-Sephacel (Ref. 170) de Pharmacia Fine Chemicals es Dietilaminoetilcelulosa presentada en forma de esferas y con un grado de entrecruzamiento que le confiere alta capacidad. La columna de 30 x 1.5 cm se equilibra a 4°C con buffer Tris.Cl 10mM, EDTA 1.5mM, 2-Mercaptoetanol 5mM, pH7.6, con un flujo de 30ml/h.

El homogenato inicial (ver 1.1), previamente dializado contra el buffer de equilibrio, se sembró y corrió con un gradiente lineal de 0 a 0.1M de ClNa en dicho buffer, volumen

total 500 ml. Se recogieron fracciones de 5 ml. Los eluidos del pico de actividad de la CK fueron mezclados en un solo tubo que se denominó 'pico de DEAE' y que fue utilizado para continuar con la purificación.

1.2.2- Cromatografía de Adsorción en Hidroxiapatita Ultrogel (HAU)

Se utilizó HAU (IBF Reactifs-Pharmindustrie) que es un gel de agarosa en forma de esferas con cierto grado de entrecruzamiento entre las cadenas de polisacáridos que mantienen atrapados a microcristales de Hidroxiapatita. La Hidroxiapatita presentada en estas condiciones ofrece mayor velocidad de flujo, menor eliminación de partículas, mayor estabilidad frente a pH extremos y frente a alta temperatura que la Hidroxiapatita convencional (HTP), la cual no posee entrecruzamiento entre las cadenas de polisacáridos.

La columna de 30 x 1.8 cm fue equilibrada a 4°C con un buffer Tris-ClH 10mM, EDTA 1.5mM, 2-Mercaptoetanol 5mM, pH7.6. Se sembró el pico de DEAE (ver 1.2.1) previamente dializado contra el buffer de equilibrio y se corrió con un gradiente lineal de 0 a 0.1M de PO₄Na pH6.8, volumen total de 500 ml. Se recogieron fracciones de 5 ml. La columna fue regenerada con buffer Fosfato de Potasio 0.5M pH6.8.

1.2.3- Cromatografía de Adsorción
en Hidroxiapatita (HTP)

Se utilizó Bio-Gel HTP (Bio-Rad Laboratories) en una columna de 30 x 1.8 cm preparada acorde a las especificaciones de Tiselius (Ref. 171,172) y equilibrada con buffer Fosfato de Sodio 5mM, 2-Mercaptoetanol 5mM, pH6.5. Se sembró el pico de DEAE (ver 1.2.1) previamente dializado contra el buffer de equilibrio. Se utilizaron diferentes gradientes lineales de buffer Fosfato de Potasio 5-100mM, 5-200mM y 5-500mM, con 2-Mercaptoetanol 5mM, pH6.5, volumen total 500ml. Se recogieron fracciones de 5ml.

Las fracciones del pico de actividad de CK que mostraron una sola banda de 49000 en PAGE-SDS (ver 12) fueron mezcladas, una parte fue alicuotada y conservada en hielo en cámara fría hasta el momento de su uso y otra parte fue dializada contra H₂O, alicuotada, liofilizada y conservada a -80°C.

2- Obtención de Inmunesuero de Conejo

La sangre del conejo se extrajo con jeringa de la vena principal de la oreja. Se tomó la primera muestra de sangre para utilizar como control negativo cinco días antes de empezar la inmunización. Todas las inmunizaciones se llevaron a cabo

por inyecciones intradérmicas en el lomo del conejo previo corte del pelo y desinfección de la zona con mertolate.

Se inyectaron 400ug de la CK-BB liofilizada tomados en 200ul de H₂O y completamente emulsionados con 200ul de adjuvante completo de Freund.

A los 21 días se le administró el primer booster. Debido a la carencia en ese momento de la CK-BB pura, se utilizó una alícuota obtenida del pico de la primera columna de hidroxapatita (ver 1.2.3), de la cual se purificó la CK-BB mediante electroforesis. La alícuota fue sembrada en PAGE-SDS de 1.5mm de espesor, de donde la banda correspondiente al peso molecular de la cadena polipeptídica de la CK-BB fue removida. Para ello se cortó el gel verticalmente por la mitad de los canales de los extremos derecho e izquierdo del mismo, cuidando de hacer marcas identificatorias. Dichos extremos fueron teñidos con Coomassie blue (ver 12) y luego, de acuerdo a las marcas fueron colocados en sus respectivos lugares a los costados del gel. Así se ubicó la posición de la banda correspondiente a la CK-B en el gel sin teñir. Se cortó horizontalmente dicho trozo que contenía aproximadamente 50ug de CK-BB, se lo homogeneizó a través de sucesivos pasajes por una aguja y se lo utilizó para inyectar el conejo. A los 21 días una muestra de sangre fue tomada.

Transcurridos 12 días se administró el segundo booster con

400ug de CK-BB liofilizada tomada en 300ul de H₂O y perfectamente emulsionada con 300ul de adjuvante incompleto. Muestras de sangre fueron tomadas a los 9 y a los 21 dias.

Luego de transcurridos 7 dias se le administró el tercer y ultimo booster de 80ug de CK-BB liofilizada tomada en 300ul de H₂O y perfectamente emulsionada con 300ul de adjuvante incompleto. Se tomó una muestra de sangre a los diez días. En todos los casos la sangre se dejo coagular a temperatura ambiente. Se separo el suero y se obtuvo el titulo de anticuerpos por SIA (ver 16). El suero se conservo en alicuotas a -80°C.

3- Purificación de las IgG de Suero de Conejos por Columna de Proteina A-Sepharosa

Se utilizó Proteina A de estafilococo, (Ref. 173) covalentemente unida a Sepharosa CL-4B (2.7g) (Pharmacia Fine Chemicals) embebida en buffer fosfato 0.1M pH8 (10ml de gel) y empaquetada en una columna de 25 x 0.5 cm, a 4°C. El suero de los conejos inmunizados fue diluído 1:4 en el buffer de equilibrio. Se eluyo con buffer Fosfato de Sodio 0.1M pH7.0. Se recogieron fracciones de 1ml en las que se determino el pH y la Absorbancia a 280nm. Alcanzado en el eluído el pH7 se eluyó con buffer Fosfato de Sodio 0.1M pH6, luego con buffer Citrato 0.1M pH5, pH4 y pH3. Los eluídos del pico de Absorbancia a 280nm

fueron mezclados y neutralizados. Para concentrar las IgG se filtro utilizando filtros Amicon o se precipitó con sulfato de amonio saturado al 80%. El precipitado obtenido luego de centrifugar a 25000 rpm por 1h a 4°C fue resuspendido en H₂O.

La concentración de IgG se llevó a 1mg/ml y se conservó alicuotada, en hielo, en cámara fría a 4°C.

4- Inmunodifusion Bidimensional: Ouchterlony

Se utilizaron portaobjetos (6 x 2 cm) sobre los cuales se depositó 3ml de agar al 1% en buffer fosfato salino. Luego de solidificado se realizaron marcas con un aparato que producía seis pozos exteriores y uno interior. El agar era removido de los pozos por succion. Las proteínas liofilizadas y resuspendidas en buffer PBS con NP-40 al 0.1% fueron sembradas en los pozos. En los casos en que el volumen a sembrar era mayor del volumen admitido por el pozo, se sembró y dejó penetrar sucesivamente las veces necesarias. Se incubó a temperatura ambiente en cámara húmeda por 48hs, luego se lavó por inmersión en buffer fosfato salino durante varias horas, seguidamente se lavó con H₂O y finalmente se tiñó con Coomassie Brilliant Blue R-250.

Para la visualización de las bandas radioactivas la

Ouchterlony (Ref. 174) fue secada a temperatura ambiente, rociada con EN³HANCE Spray (New England Nuclear) siguiendo las indicaciones del fabricante y autoradiografiada en película Kodak X-Omat AR a -80°C por el tiempo necesario.

5- Digestiones Químicas

5.1- Digestión con Acido Fórmico 88%

Se resuspendieron 100 ug de proteína liofilizada en 200ul de HCOOH 88%. Se dejó digerir durante 24 hs a 37°C y luego se congeló y liofilizó. Se resuspendió en 500ml de H₂O y se liofilizó cuatro veces consecutivas. Las muestras se conservaron a -80°C (Ref. 175).

5.2- Digestión con Acido Fórmico 70%

Se resuspendieron 20ug de proteína liofilizada en 50ul de HCOOH 70%, NP-40 0.1%. Se dejó digerir por 24hs a temperatura ambiente y luego se congeló y liofilizó. Se resuspendió en 500ml de H₂O y se liofilizó cuatro veces consecutivas. Las muestras se conservaron a -80°C (Ref. 175).

5.3- Digestión con Acido Clorhídrico 0.04N

20ug de proteína liofilizada fueron resuspendidos en 40ul de NP-40 0.1% y tratados con 25ul de ClH 0.1N por 24hs a temperatura ambiente, neutralizados con NaOH 0.1N, congelados, liofilizados, resuspendidos en 500ml de H₂O y liofilizados cuatro veces consecutivas. Las muestras se conservaron a -80°C (Ref.175).

5.4- Digestión con Bromuro de Cianógeno en Acido Clorhídrico 0.06N

100ug de proteína liofilizada resuspendidos en 70ul de NP-40 0.1% fueron tratados con 125ul de una solución de 1.8mg de BrCN por ml de ClH 0.1N por 24hs a temperatura ambiente, neutralizados con NaOH 0.1N, congelados, liofilizados, resuspendidos en 500ml de H₂O y liofilizados cuatro veces consecutivas y finalmente conservados a -80°C (Ref. 176).

5.5- Digestión con Bromuro de Cianógeno en Acido Fórmico 70%

Se resuspendieron 100ug de proteína liofilizada en 250ul de

una solución de 15mg de BrCN por ml de HCOOH 70%, NP-40 0.1%. Se dejó digerir por 24hs a temperatura ambiente, se congeló y liofilizó. Se resuspendió en 500ml de H₂O y se liofilizó cuatro veces consecutivas. Las muestras fueron conservadas a -80°C (Ref. 176).

6- Digestiones Enzimáticas

6.1- Digestión con Tripsina

La solución madre de Tripsina fue de 1mg/ml en ClH 0.1mM, Cl₂Ca 0.1mM. Se disolvió 50ug de proteína en 25ul de Urea 8M, NH₄HCO₃ 0.4M colocándola a 37°C por 50min. Se agregó 1x p/p de Tripsina/proteína (10ul de una dilución 1:20 de la solución madre en ClH 0.1mM, Cl₂Ca 0.1mM) y se llevó a 100ul con ClH 0.1mM, Cl₂Ca 0.1mM manteniendo el pH en 8.5 con NH₄OH, dejando digerir por 4hs. Se adicionó 1x p/p nuevamente y se dejó digerir por 2hs. Se agregó 1x p/p y se dejó digerir por 1h, siempre a la misma temperatura. La digestión fue detenida por congelamiento. Se liofilizó y se conservaron las muestras a -80°C (Ref. 177).

6.2- Digestión con Quimotripsina

Se utilizaron las mismas soluciones y metodología que en 6.1 con Quimotripsina en lugar de Tripsina. La proteína se mantuvo en el buffer con Urea por 1h y luego se digirió por 5hs 30min con Quimotripsina y se realizó solamente un segundo agregado de la enzima dejando actuar por 1h 30min. Se congeló y liofilizó. Las muestras fueron conservadas a -80°C (Ref. 178).

6.3- Digestion con Clostripain

Se utilizó una solución de Clostripain de 1mg/ml en Cl_2Ca 20mM, 2-Mercaptoetanol 0.1%. 50ug de la PrI y 65ug de la CK-BB fueron resuspendidos respectivamente en 30ul de una solución de Urea 8M en NH_4HCO_3 0.4M, colocándola a 37°C por 50min. Se agregó 5ul de la solución de Clostripain y 25ul de Cl_2Ca 20mM, 2-Mercaptoetanol 0.1% y se dejó digerir por 2hs a la misma temperatura. Se agregó 5ul de la solución de Clostripain y se dejó digerir por 2hs a la misma temperatura. Se repitió este último paso dos veces más totalizando 8hs de digestión. Se congeló y liofilizó. Las muestras se conservaron a -80°C (Ref. 179).

7- Isoelectroenfocado en
Gel de Poliacrilamida (PAGIEF)

Se utilizó la unidad 2117-100 de IEF de LKB. Los geles de 2mm de espesor fueron preparados con una mezcla de 30ml de la solución de Acrilamida, 8ml de Glicerol y 3ml de la mezcla apropiada de Anfolitos. Se llevó a 60ml con H₂O, se degaseó y se le agregó 500 ul de Persulfato de Amonio de 22.8mg/ml.

Las soluciones de los electrodos utilizadas fueron: NaOH 1N en el cátodo(-) y Acido Aspártico 0.04M en el ánodo(+) y los marcadores de punto isoelectrico: Amiloglucosidasa de Aspergillus, 3.65; Inhibidor de Tripsina de poroto de soja, 4.55; Beta-Lactoglobulina (A) de leche bovina, 5.13; Anhidrasa Carbonica B de eritrocitos bovinos 5.85; Mioglobina porcina, 6.55 y Mioglobina trifluoracetilada equina, 6.86. El enfocado se llevo a cabo a 60W, el máximo voltaje obtenido fue de 2700V, por 1h.

Al término de la corrida el gel fue cortado, por donde no había muestra, en tiras de 2.1mm que se colocaron en tubos con 1ml de H₂O donde se determinó el pH. El resto del gel fue fijado con una solución de Acido Sulfosalicílico 5%, Acido Tricloroacético 10% por 30min. Se decoloró en solución decolorante de Metanol:Acido Acetico:H₂O (3:1:6) por 24hs, luego se tiñó con Coomasie Brilliant Blue 0.2% en solución

decolorante por 1h y finalmente se decoloró hasta que el fondo del gel quedo claro haciendo varios cambios de la solución decolorante.

Para la visualización de las bandas radioactivas el gel fue tratado con EN³HANCE para autoradiografía de New England Nuclear (Ref. 180).

8- Condiciones de Trabajo con ARN

Todas las soluciones utilizadas fueron autoclavadas o preparadas en agua autoclavada con drogas reservadas para el trabajo con ARN que se tomaron con espátulas esterilizadas. Se prepararon soluciones madres las cuales se diluyeron con H₂O esteril a los volúmenes adecuados en el momento de su uso. La solución madre 10% de SDS fue sometida a 65°C durante 1h. Los capilares, tubos y columnas de vidrio fueron siliconados y esterilizados. Los tubos de plástico y las conexiones utilizadas en las columnas fueron autoclavados. Todo el manipuleo del material y el trabajo con ARN se realizó con guantes.

La concentración y pureza de las preparaciones se obtuvo por medida de la absorbancia a 260 y 280nm en cubetas de cuarzo esterilizadas. 1mg de ARN equivale a 23 unidades de A₂₆₀.

Cuando el ARN está puro la relación de A260/A280 oscila entre 1.8 y 2.0.

8.1- Obtención de ARN total:

Método de ClCs/Isotiocianato de Guanidina

Se utilizaron ratas Wistar adultas, de tres meses de vida y ratas prepúberes de 18 a 21 días de vida, obtenidas de Griffin Laboratory, Wadsworth Center for Laboratories & Research, Albany, NY. Las ratas adultas fueron sacrificadas mediante golpe de las mismas contra la mesada y las ratas prepúberes por suave dislocación cervical.

Los úteros extraídos fueron separados cuidadosamente de todo tejido adiposo e inmediatamente congelados en nitrógeno líquido. Se registró su peso y se agregó 5 volúmenes de una solución 4M Isotiocianato de Guanidina, 5mM Citrato de Sodio (pH7), 0.1M 2-Mercaptoetanol, 0.5% Sarkosyl. El tejido fue dispersado en un homogenizador (Polytron) a temperatura ambiente utilizando 4 veces pulsos en posición 6, de 15seg cada uno, con intervalos de 1min. Por cada 2.5ml del homogenato se adicionó 1g de ClCs, se mezcló y se depositó cuidadosamente sobre 1.2ml de ClCs 5.7M en EDTA 0.1m pH7.5 previamente colocados en tubos de centrifuga. Se centrifugó por 16hs y 20min a 45000rpm a 20°C en rotor Beckman SW60Ti.

Los sobrenadantes fueron descartados por inversión de los tubos y se limpiaron las paredes con un hisopo cuidando de no acercarse al transparente precipitado observado en el fondo de los tubos.

Cada precipitado fue redissuelto en 300ul de buffer TES (10mM Tris.Cl pH7.4, 5mM EDTA, 1% SDS) y juntados en un tubo de vidrio Corex de 25ml. Cada tubo fue lavado con 300ul del mismo buffer y los lavados fueron agregados al tubo Corex. Se realizó una extracción con igual volumen de una mezcla 4:1 de Cloroformo y 1-Butanol previamente saturada con bufer TES. Se centrifugó para separar bien las fases, y se transfirió la fase acuosa a otro tubo Corex. Se extrajo la fase organica con igual volumen de buffer TES y se colocó esa fase acuosa en el mismo tubo que la anterior. Se agregaron 0.1 volúmenes de Acetato de Sodio 3M pH5.2 y 2.2 volúmenes de Etanol y se dejó a -20°C toda la noche (Ref. 181).

8.2-Obtención de ARN-mi

Cromatografía en Oligo(dT)-Celulosa

Se preparó una columna de 3 ml de Oligo(dT)-Celulosa tipo 2 resuspendida en el buffer de sembrado (20mM Tris.Cl pH7.6, 0.5M ClLi, 1mM EDTA, 0.1% SDS). Se lavó sucesivamente con H₂O, con NaOH 0.1M, EDTA 5mM y nuevamente con H₂O hasta que el eluido alcanzo pH7. La columna se equilibró con el buffer de

sembrado. El ARN total (ver 8.1) se centrifugó en una Sorvall a 8000 rpm por 60min a -10°C. El sobrenadante se separó y conservó a -20°C. El precipitado se resuspendió en 1ml del mismo sobrenadante y se colocó en un tubo Eppendorf y centrifugó por 1h a 10000rpm a -10°C. El sobrenadante se separó y se dejó drenar el tubo. El precipitado se resuspendió en 500ul de H₂O y una alícuota fue tomada para ser analizada en gel de Agarosa al 1% (ver 11). El precipitado resuspendido en los 500ul de H₂O se calentó a 65°C por 5min. Se le agregó igual volumen de buffer de sembrado 2x calentado a la misma temperatura, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se sembró.

Fracciones de 0.5ml fueron recogidas eluyendo con el buffer de sembrado hasta que la A₂₆₀ bajo casi a cero. Los eluidos del pico de absorbancia fueron juntados, calentados a 65°C y sembrados nuevamente. El último paso fue repetido por segunda vez.

La columna se lavó hasta que la A₂₆₀ fue casi cero. Se comenzó entonces la elución del ARN poli A+ con buffer 10mM Tris.Cl pH7.5, 1mM EDTA, 0,05% SDS. Los eluidos del pico de absorbancia a 260nm fueron juntados, llevados con Acetato de Sodio 3M a una concentración final de 0.3M y precipitados con 2.2 volúmenes de Etanol a -20°C durante toda la noche. Se centrifugó a 8000 rpm por 1h a -10°C, el precipitado se resuspendió en 1ml del mismo sobrenadante y se colocó en un tubo Eppendorf. Se centrifugó a 10000 rpm por 1h a -10°C. Se

descartó el sobrenadante, se dejó drenar el tubo y se resuspendió el precipitado en H₂O llevandolo a 2ug/ul. Se conservó a -180°C (Ref. 182).

9- Fraccionamiento de ARN-m
en Gradiente de Sacarosa

Se utilizó un gradiente de Sacarosa 4 a 20% preparado en buffer 3mM EDTA, 70% Formamida, 3mM Tris.Cl, pH7.9, volumen total 4ml. Se sembraron 100ug de ARN-m (ver 8.2) en 100ul del mismo bufer y se centrifugó a 186000 g por 20hs a 25°C en rotor Beckman SW41.

El gradiente fue fraccionado utilizando un aparato que succionaba desde la superficie del líquido a través de un sensor de tensión superficial. Se recogieron fracciones de 8 gotas en tubos Eppendorf (130 a 150ul por tubo). Se agregó 2ug de ARN-t, 0.1 volúmenes de Acetato de Sodio 3M pH5.2 y 2.2 volúmenes de Etanol y se dejó toda la noche a -20°C. Se centrifugó en una Sorvall a 10000 rpm por 1h a -10°C, se descartó el sobrenadante, se dejó drenar y se redisolvió en 2ul de H₂O. Se conservó a -180°C (Ref. 183).

10- Traducción In Vitro de ARN-m
en Lisados de Reticulocitos de Conejos

Se trabajó con los equipos de traducción de lisado de reticulocitos de conejo de New England Nuclear con [3,4,5-³H]-L-Leucina. El aminoácido marcado, que se comercializa preparado en ClH 0.01N fue neutralizado con 100ul de NaOH 0.1N.

Cuando el ARN-m poli A+ a traducir provenía de la columna de Oligo(dT)-Celulosa (ver 8.2) se llevó a cabo la traducción de cada muestra por duplicado en tubos Eppendorf colocando los reactivos en el orden indicado en el siguiente esquema:

	Blanco	Control	Muestra
1-Premezcla	13ul	13ul	13ul
2-ARN-m control		1ul	
3-ARN-m muestra			2ul
4-Agua	2ul	1ul	
5-Lisado	10ul	10ul	10ul

La Premezcla se preparó en las concentraciones indicadas por el fabricante. El ARN-m control fue el mensajero de la Globina y se utilizó diluido 1:5 en H₂O.

Cuando el ARN-m poli A+ provenía del gradiente de Sacarosa (ver 9), se llevó a cabo la traducción en los mismos tubos del fraccionamiento.

Los volúmenes del ensayo fueron tomados con pipeta a capilares (Drummond series 500, Digital-Microdispenser). Rápidamente se mezcló el contenido de los tubos en un vortex y se centrifugó en una Eppendorf de mesa asegurando que toda la mezcla estuviese depositada en el fondo. Se incubó a 37°C por 1h y se agregó 25ul de bufer Tris.Cl 1M, pH10.7. Se incubó por 10min más a 37°C y los tubos se colocaron en hielo.

Evaluación de la traducción:

Se sembró por duplicado 1ul de cada tubo en papel de filtro Whatman GF/C con pipeta capilar. Se lavó el filtro con TCA frío al 10% en un vaso de precipitados, luego se colocó el filtro con TCA 5% caliente y se hirvió por 5min. Se lavó dos veces con Etanol 95% y luego con Eter. Se dejó secar al calor de una lámpara, se cortó separando las muestras sembradas. Se colocó en viales con 500ul de Protosol (New England Nuclear), se calentaron a 60°C por 30min, se enfriaron, se les agregó

50ul de Acido Acetico Glacial y por ultimo 10ml de Econofluor (New England Nuclear). Se conto en el canal de Tritio de un contador Beckman de centelleo líquido.

Los tubos de la traducción in vitro se conservaron a -20°C.

11- Electroforesis en Gel de Agarosa al 1%

Se utilizó una cuba y una fuente de electroforesis LKB para geles horizontales. Se prepararon geles de 15ml de Agarosa al 1% en bufer Tris.Cl 0.4M, Acetato de Sodio 0.2M, Acido Acetico 0.26M pH7.5. Se mezcló 2ul de ARN disuelto en H₂O (1ug/ul) con 8ul del buffer, se calentó por 5min a 65°C y se agregó 1ul de la Agarosa de sembrado (0.25mg de Bromofenol, 12.5ml de Glicerol, 0.625g de Agarosa, 12.5ml de H₂O autoclavada) previamente redisuelta a 100°C y mantenida a 65°C por 5min. Se mezcló rápidamente y se sembró en el gel. Se corrió a 60V, 1h en el cuarto frio. Se utilizaron como marcadores de tamaño a los fragmentos de restricción del Bacteriofago Lambda cepa CI indl ts 857 Sam7 digerido con BamHI de 16841, 7233, 6770, 6527, 5626, 5505 pares de bases o al ARN-r 18S y 23S de E.coli. La corrida se visualizó por tinción con Bromuro de Etidio 1mg/l durante 30min. Se fotografiaron los geles en un transiluminador de luz UV, con pelicula Polaroid tipo 57 y filtros amarillo y rojo.

12- Electroforesis en Gel de Poliacrilamida
en Dodecil Sulfato de Sodio (PAGE-SDS)

Se utilizó el sistema descrito por Laemmli (Ref 184), con cubas y fuentes de electroforesis LKB para geles de 10 x 15cm. Los geles preparados al 10% o 15% fueron corridos a 3 mA por canal sembrado.

Para el análisis de los eluidos de las columnas (ver 1) se sembró 20ug de proteína por canal previamente tratada a 80°C por 3min en el bufer de muestra.

Para el análisis de las digestiones químicas (ver 5), se resuspendió el liofilizado en 70ul del bufer de muestra, se calentó a 80°C por 10min y se sembró.

Para el análisis de las proteínas obtenidas por traducción in vitro (ver 10) se calentó a 80°C 40 ul del ensayo con 40ul del bufer de muestra por 10min y se sembró.

Los siguientes patrones de peso molecular fueron utilizados: Fosforilasa b, 94000; Albúmina sérica, 67000; Ovalbumina, 45000; Anhidrasa Carbónica, 30000; Inhibidor de Tripsina de poroto de soja, 20000 y α -Lactoalbumina, 14400. Las tinciones se realizaron con Coomassie Brilliant Blue R-250.

Segun el objetivo los geles fueron:

a) Teñidos, fotografiados, secados y conservados envueltos en hojas de plástico.

b) Teñidos, fotografiados y cortados por canal en segmentos de 2mm. Se colocaban los trozos en viales, se digería con 0.5ml de H₂O₂ al 30% a 80°C y se medía la radioactividad en un contador de centelleo Beckman utilizando Aquasol fluor (New England Nuclear).

c) Utilizados sin teñir para electrotransferir a Nitrocelulosa.

d) Teñidos, fotografiados, secados, analizados en un densitómetro ACD-18 (Gelman Sciences, inc.) a 520nm y conservados envueltos en hojas de plástico.

13- Transferencia Electroforética de Proteínas a Membranas de Nitrocelulosa (Western Blotting)

Se utilizó la unidad de electrotransferencia LKB 2005. El bufer de transferencia fue 25mM Tris.Cl pH8.3, 150mM Glicina, 20%(v/v) Metanol. Todas las electrotransferencias se realizaron de PAGE-SDS a Nitrocelulosa. La membrana de Nitrocelulosa se corto del tamaño del gel a transferir y se mantuvo sumergida por

10min en el buffer de transferencia. Se colocó sobre una grilla, la esponja y dos papeles de filtro cortados del tamaño del gel y previamente empapados en el buffer. Luego se colocó el gel y la membrana de Nitrocelulosa (previamente mantenida en el buffer de transferencia por 10min) cuidando de no dejar burbujas y haciendo marcas para determinar la posición de los canales de corrida. Se agregaron dos papeles de filtro, otra esponja y finalmente la otra grilla y se ajustó en ambos extremos con bandas de goma elásticas. Se electrotransfirió por 12hs a 100V, a 4°C y con circulación de H₂O a la misma temperatura.

14- Inmunodetección de Proteínas en Membranas de Nitrocelulosa

En los PAGE-SDS a electrotransferir estaban corridos los patrones de peso molecular en los canales de los extremos derecho e izquierdo; una vez realizada la transferencia se cortó la Nitrocelulosa separando uno de los dos canales de los extremos. Dicho trozo se coloreó con una solución de Coomassie blue R-250 0.2%, Metanol 40%, Acido Acético 10% durante 5min, luego se decoloró dejando por menos de 5min en Metanol 90%, Acido Acético 2%, se lavó con agua y se dejó secar al aire. Se conservó envuelta en papel poliéster para utilizarla en la posterior ubicación del peso molecular de la/s banda/s que se visualizaran luego del revelado aplicado al resto de la

Nitrocelulosa.

La membrana fue sumergida en una solución de Gelatina al 3% en PBS dejando agitar por varias horas a temperatura ambiente y luego por dos días a 4°C. Se removió con cuidado la membrana separándola de la capa de gelatina sólida, se lavó con PBS y se sumergió en la solución del primer anticuerpo.

Según la sensibilidad de detección requerida y según el primer anticuerpo utilizado se procedió de diferentes maneras:

14.1- Cuando las proteínas transferidas provinieron de la purificación de CK-BB de cerebro de rata (ver 1) o de útero de rata prepúber inducida por Estrógeno (Ref. 139):

La membrana se sumergió en una dilución de la IgG de conejo purificada (ver 3) contra CK-EIP o contra CK-BB, (1mg en 100ml de PBS con 0.05% v/v de Tween-20 (TPBS)) y se dejó agitando suavemente toda la noche a temperatura ambiente. Se lavó cuatro veces durante 10min cada vez, con TPBS y una vez con PBS.

Se sumergió la membrana en una dilución 1:2000 en TPBS de inmunosuero de cabra contra IgG de conejo (H+L) purificada por afinidad y conjugada con Peroxidasa (Bio-Rad Laboratories), agitando suavemente por 2hs a 4°C. Se lavó cuatro veces por 10min cada vez con TPBS, una vez con PBS y rápidamente con H₂O destilada.

Se reveló sumergiendo la Nitrocelulosa en una solución a temperatura ambiente preparada en el momento mezclando 60ml de una solución de 20mg de 4-Cloro 1-Naftol por ml de Metanol con 100ml de PBS previamente adicionados con 60ul de H₂O₂ 30% enfriada en hielo. Se dejó de 5 a 15min según la aparición de las bandas azules. Se paró el revelado sumergiendo la membrana en H₂O destilada por 10min. Se dejó secar al aire y se guardó la Nitrocelulosa envuelta en hojas de plástico.

14.2- Cuando las proteínas transferidas provinieron de la traducción in vitro del ARN-m poli A+:

Se sumergió la membrana en una dilución de IgG de conejo purificada (ver 3) contra CK-EIP o contra CK-BB (1mg en 100ml de TPBS) y se dejó agitar toda la noche a temperatura ambiente. Se lavó cuatro veces durante 10min cada vez con TPBS y una vez con PBS.

La membrana se sumergió en una solución de Proteína A marcada con ¹²⁵I de 10⁶cpm/ml en TPBS durante 30min con agitación suave, se lavó 5 veces con PBS 30min cada vez, se secó a temperatura ambiente y se autoradiografió con pantalla intensificadora (DuPont) a -70°C.

14.3- Cuando las proteínas transferidas provinieron de la traducción in vitro del ARN-m poli A+.

Se sumergió la membrana en una dilución 1:1000 en PBS del anticuerpo monoclonal MAb-28AF (Ref. 140), agitando suavemente toda la noche a temperatura ambiente. Se lavó cuatro veces por 10min cada vez en TPBS y una vez en PBS.

La membrana se sumergió en IgG de cabra contra IgM de raton (Cappel) 1:3000 en TPBS por 5ha con agitación suave a temperatura ambiente, se lavó cuatro veces en TPBS por 10min cada vez y en PBS por 10min.

La Nitrocelulosa se sumergió en una solución de Proteína A marcada con ^{125}I de 10^6cpm/ml en TPBS durante 30min con agitación suave, se lavo 5 veces con PBS 30min cada vez, se secó a temperatura ambiente y se autoradiografió con pantalla intensificadora (DuPont) a -70°C (Ref. 185).

15- Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC)

en Fase Reversa

El agua y los solventes utilizados fueron grado HPLC.

Los productos de las digestiones enzimáticas (ver 6) se disolvieron en 90ul de H₂O, luego se agregó 20ul de Acido Acético Glacial y se llevó a 200ul volumen final con H₂O.

Todas las cromatografías se realizaron en un equipo HPLC Beckman con bombas modelo 110A y con columna de fase reversa Aquapor Octyl RP-300 (Brownlee Labs), utilizando como solvente A 0.1% de F₃C-COOH y como solvente B 0.1% F₃C-COOH, 90% H₃C-CN con un gradiente lineal de 0 a 60% de B en 60' a 0.6ml/min. Los peptidos se detectaron en el efluente por lectura de la absorbancia a 229nm. El gráfico con los tiempos de elución y la cuantificación de las áreas de los picos fueron obtenidos con un integrador Altex C-R1A (Ref. 186).

16- Enzimoinmunoensayo en Portaobjeto (SIA)

Portaobjetos recubiertos con material hidrofóbico dejando 18 círculos de 3mm de diametro (manufacturados por Roboz Surgical Instruments Co.) fueron limpiados con Etanol 95%. Se depositaron cinco a diez ul conteniendo 1ug del Antígeno por círculo y se dejó secar por evaporación. Luego se depositó por círculo 10ul de CM (medio de cultivo Dulbecco modificado que contiene aminoácidos no esenciales, L-Glutamina, 5% de suero de ternera y 10% de suero de caballo libre de γ -Globulina (v/v), obtenido de laboratorios Gibco), colocando el portaobjeto en cámara húmeda por 30min. Se procedió seguidamente a lavar el

portaobjeto por goteo suave de H₂O y se dejó secar. Se depositó el primer anticuerpo (diluido en CM si era necesario) por 30min manteniendo el portaobjeto en cámara húmeda. Se lavó por goteo suave con CM y se depositó 10ul de CM por círculo por 10min en cámara húmeda. Se lavó con H₂O y se dejó secar. Se colocó el segundo anticuerpo, IgG de cabra contra conejo marcada con Peroxidasa (Cappel) diluida 1:1000 en CM, por 30min en cámara húmeda. Se lavó con CM y con H₂O y se dejó secar. Finalmente 10ul de la solución del sustrato: 0.1% de o-Fenilendiamina, 0.02% de H₂O₂ 30% (v/v), 0.1M Citrato de Sodio, pH4.5, fueron depositados por círculo.

Se realizó la lectura de la Absorbancia a 410nm (minireader MR590 de Dynatech Instruments) a los 5, 15 y 30min. Los controles negativos incluyeron: omisión del antígeno, omisión del primer anticuerpo, omisión del segundo anticuerpo y suero del mismo animal utilizado para obtener el primer anticuerpo, sangrado previamente a la iniciación del esquema de inmunización (Ref. 187).

17- Determinación de la Actividad Enzimática de Creatina Quinasa (CK)

Se utilizó el equipo CK-NAC de Boehringer que se basa en las siguientes reacciones:

CK

Creatina Fosfato + ADP<----->Creatina + ATP

HK

ATP + Glucosa<----->G-6-P + ADP

G-6-PDH

G-6-P + NADP⁺<----->6-PG + NADPH + H⁺

La formación de NADPH procede a la misma velocidad que la formación de Creatina en cantidades equimoleculares. Se determinó la velocidad a la que se formaba el NADPH espectrofotométricamente por el incremento de la absorbancia a 340nm que es directamente proporcional a la actividad enzimática.

Una unidad internacional de enzima (U) se define como la cantidad de enzima que convierte 1 micromol de sustrato en 1min en las condiciones estandar.

18- Determinación de la Concentración de Proteína

La concentración de proteína fue determinada por el método de Bradford (Ref. 188) utilizando un equipo de Bio-Rad Laboratories.

RESULTADOS

I- Purificación de la Creatina Guinasa BB (CK-BB) de Cerebro de Rata Prepuber

Se procesaron en primera instancia 15 cerebros que pesaron 18.4g. La cromatografía (ver 1.2) del Homogenato Inicial (ver 1.1) en DEAE-Sephacel (ver 1.2.1) resultó en la obtención de un pico de actividad de CK que eluyó a 0.02M de ClNa. Al cromatografiar dicho pico en HAU (ver 1.2.2) se obtuvieron dos picos de actividad de CK, un pico menor que eluyó a 16mM Fosfato y un pico mayor que eluyo entre 25mM y 50mM de Fosfato. Ambos picos analizados en PAGE-SDS mostraron más de una banda de proteína si bien la banda principal correspondía al peso molecular de la cadena polipeptídica de la CK-BB. La purificación de la CK-BB en HAU no fue satisfactoria.

Se decidió utilizar una columna de Hidroxiapatita convencional como segundo paso de purificación. Para ello se comenzó con la obtención del homogenato inicial a partir de 12.74g de tejido de cerebro de rata. La cromatografía en DEAE-Sephacel resolvió en un pico de actividad de CK que eluyo a 0.02M de ClNa (Fig. 6). Dicho pico fue cromatografiado en HTP (ver 1.2.3) con un gradiente lineal de Fosfato 5mM a 500mM, obteniendo un pico de actividad que eluyó a 18mM Fosfato (Fig.

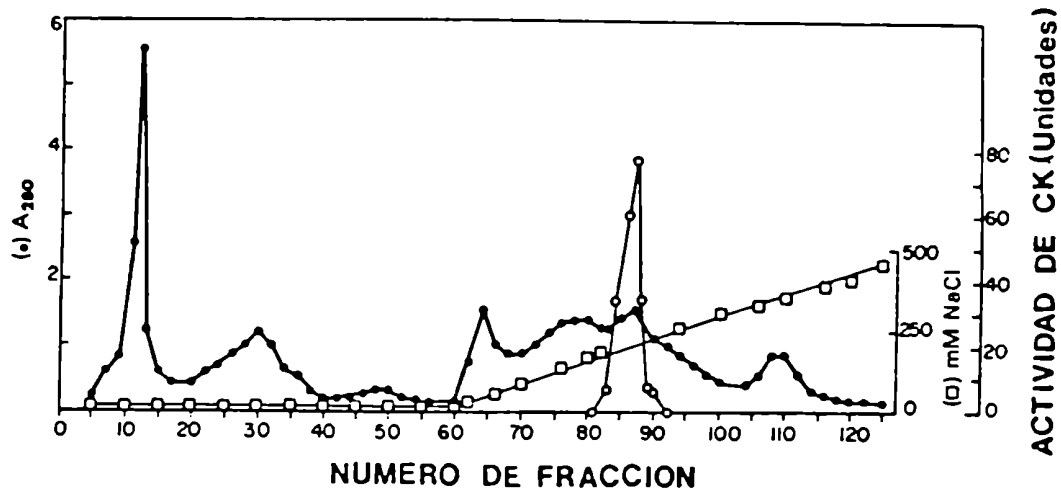


Fig. 6. Purificación de la CK-BB de cerebro de rata prepúber por cromatografía en DEAE-Sephacel. El Homogenato Inicial dializado contra el buffer de equilibrio fue corrido en una columna de DEAE-Sephacel (1.5 x 30-cm) previamente equilibrada con buffer Tris.Cl 0.01M, EDTA 1.5mM, 2B-Mercaptoetanol 5mM, pH7.6, con una velocidad de flujo de 30ml/h. La elución se llevó a cabo con un gradiente lineal (0 a 0.1M de ClNa, volumen total 500ml). Las fracciones fueron analizadas por su actividad de Creatina Quinasa.

7A). La cromatografía de dicho pico en HTP con un gradiente lineal de 5mM a 200mM resolvió en un pico de actividad (Fig. 7B) que se cromatografió nuevamente en HTP con un gradiente lineal de 5mM a 100mM (Fig. 7C).

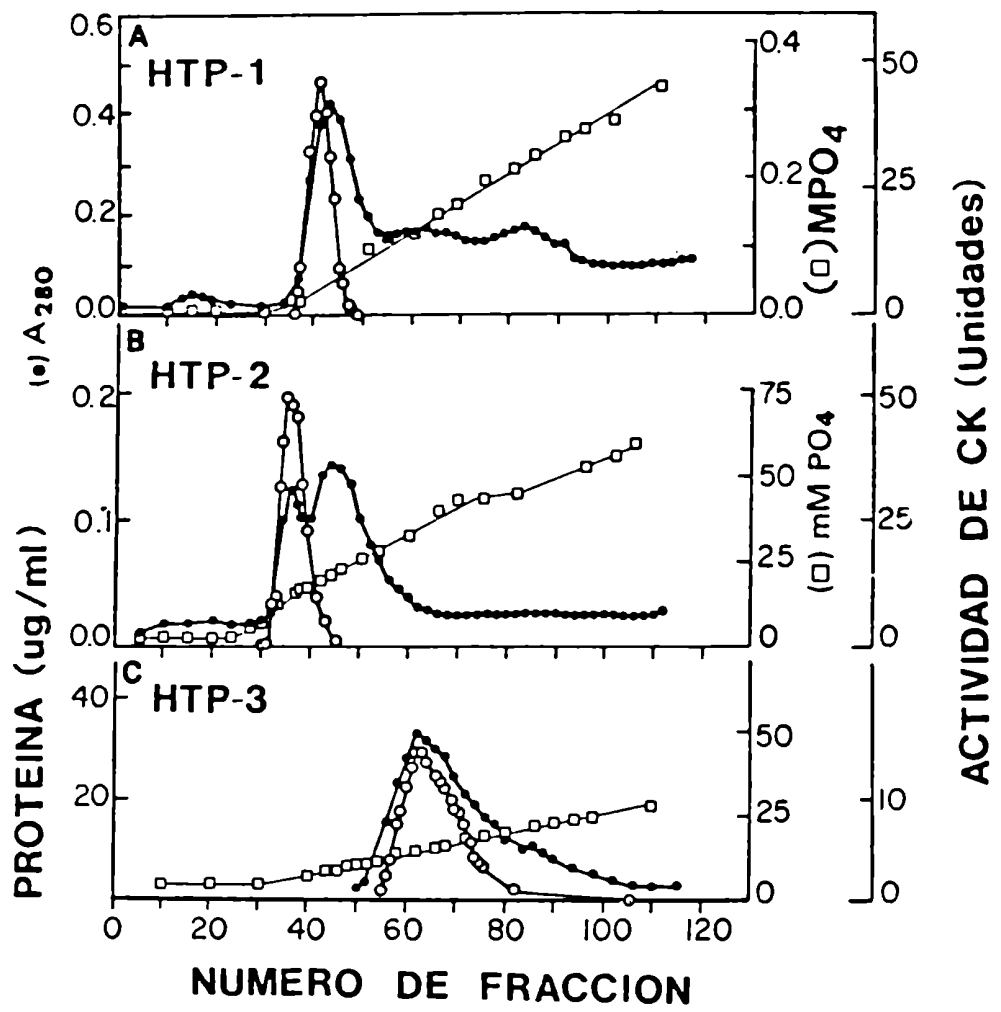
Los resultados de este primer esquema de purificación de la CK-BB de cerebro de rata son presentados en la Tabla 1.

Tabla 1

Primer Esquema de Purificación
de la CK-BB de Cerebro de Rata (12.74g)

	Act. total (U)	Prot. total (mg)	Act. esp. (U/mg)	Grado de purif.	% de recuperación
Homog. inicial	1828	224	8.1	1	100
DEAE	916	50	18.3	2.3	50
HTP-1	870	13	66.9	8.2	47
HTP-2	886	4	221.5	27.0	48
HTP-3	541	1.8	300.5	37.0	29

Fig. 7. Purificación de la CK-BB de cerebro de rata prepuber por cromatografía en Hidroxiapatita. (A) Las fracciones del pico de actividad de CK obtenidos de la columna de DEAE-Sephacel (ver Fig. 6) fueron mezcladas, dializadas contra el buffer de equilibrio y corridas en una columna de Hidroxiapatita (30 x 1.8cm) equilibrada con buffer Fosfato 5mM, 2B-Mercaptoetanol 5mM, pH6.5. Se eluyó con un gradiente lineal de 5 a 500mM de buffer Fosfato. (B) Las fracciones del pico de actividad de CK fueron mezcladas, dializadas contra el buffer de equilibrio y recromatografiadas en la misma columna previamente equilibrada. Se eluyó con un gradiente lineal de 5 a 200mM del mismo buffer. (C) Las fracciones del pico de actividad de CK se dializaron contra el buffer de equilibrio y se recromatografiaron en la misma columna con un gradiente lineal de 5 a 100mM del mismo bufer.



En cada cromatografía los eluidos del pico de actividad de CK fueron analizados en PAGE-SDS.

En la Fig. 8 se observa el perfil electroforético en PAGE-SDS (ver 12) del Homogenato Inicial (canal 2), del pico de actividad de la DEAE-Sephacel (canal 3) y de los tres picos correspondientes a las tres cromatografías en HTP (canales 4,5 y 6). Se obtuvo una sola banda de 49000 proveniente de la cromatografía en HTP con un gradiente lineal de Fosfato 5mM a 100mM (canal 6). La inmunodetección (ver 14.1) de la electrotransferencia (ver 13) de dichas fracciones, detectadas con IgG purificada de inmunosero de conejo contra la CK-EIP o contra la CK-BB (ver 3) mostró que ambos antisueros reaccionaban en todas las fracciones con una única banda de 49000 que corresponde al peso molecular de la cadena polipeptídica de la CK-BB.

La purificación de la CK-BB puede ser realizada en dos pasos: una columna de DEAE-Sephacel y una columna de HTP con un gradiente lineal de Fosfato 5mM a 100mM.

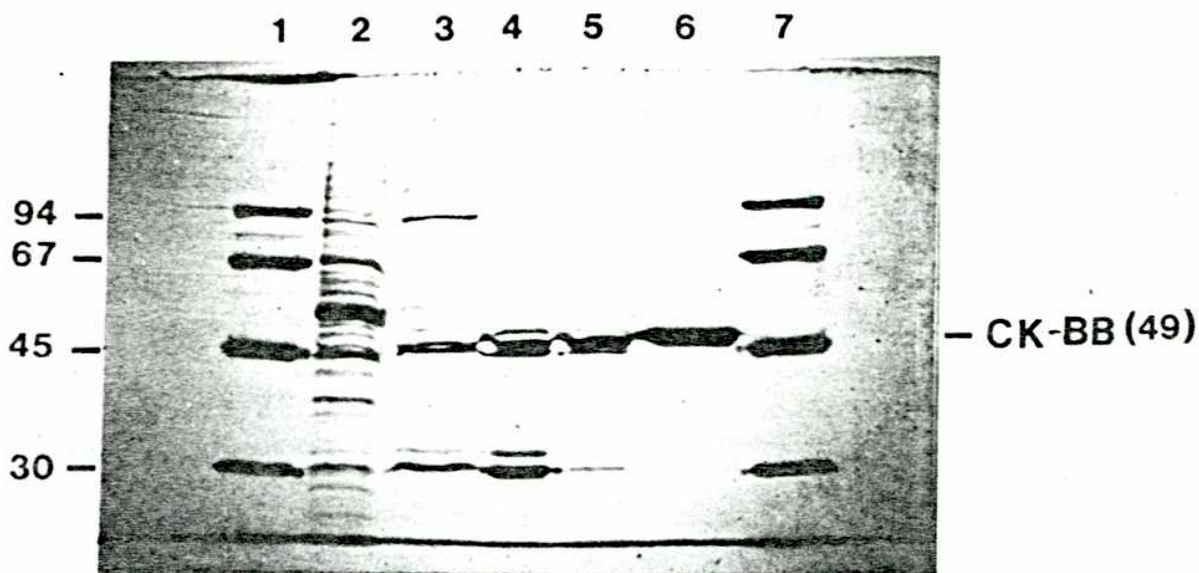


Fig. 8. Análisis en PAGE-SDS de las fracciones de la purificación de la CK-BB de cerebro de rata prepúber. Canales 1 y 7, marcadores de peso molecular (Fosforilasa b, 94000; Albúmina Sérica, 67000; Ovoalbúmina, 45000; Anhidrasa Carbónica, 30000). Canal 2, Homogenato Inicial. Canal 3, mezcla de las fracciones del pico de actividad de CK eluido de la columna de DEAE-Sepharcel (ver Fig. 6). Canales 4, 5 y 6, mezclas de las fracciones de los picos de actividad de CK eluidos de las sucesivas cromatografías en Hidroxiapatita (ver Fig 7, HTP-1, HTP-2 y HTP-3 respectivamente).

En la Tabla 2 se presentan los resultados del esquema final adoptado para la purificación de la CK-BB.

Tabla 2

Esquema Final de Purificación
de la CK-BB de Cerebro de Rata (33.5g)

	Act. total (U)	Prot. total (mg)	Act. esp. (U/mg)	Grado de purif.	% de recuperacion
Homog. inicial	4821	679	7.1	1	100
DEAE	2458	161	15.2	2.1	51
HTP	1470	3.2	459	64.6	30

Las fracciones del pico de actividad de Creatina Quinasa que mostraron una sola banda de 49000 en PAGE-SDS fueron mezcladas, una parte fue alicuotada y conservada en hielo en cámara fría hasta el momento de su uso y otra parte fue dializada contra H₂O, alicuotada, liofilizada y conservada a -80°C.

II- Comparación de la Movilidad
Electroforética de la CK-EIP y la CK-BB

La movilidad electroforética en PAGE-SDS (ver 12) de la CK-EIP de útero de rata prepúber y la CK-BB de cerebro de rata prepúber fueron comparadas.

Se observa en la Fig. 9 la electroforesis en PAGE-SDS de los marcadores de peso molecular en el canal 1; el citosol de utero de rata prepúber (Ref. 139) en el canal 2; el pico de actividad de CK de la cromatografía en DEAE-Sephacel (Ref. 139) en el canal 3; la CK-EIP eluída en el pico de actividad de la cromatografía en HAU (Ref. 139) en el canal 4 y la CK-BB de cerebro de rata prepúber eluída en el pico de actividad de CK de la cromatografía en HTP (ver 1) en el canal 5.

Se observa que la movilidad electroforética de las subunidades polipeptídicas de la CK-EIP y la CK-BB son idénticas, correspondiendo a un peso molecular aparente de 49000.

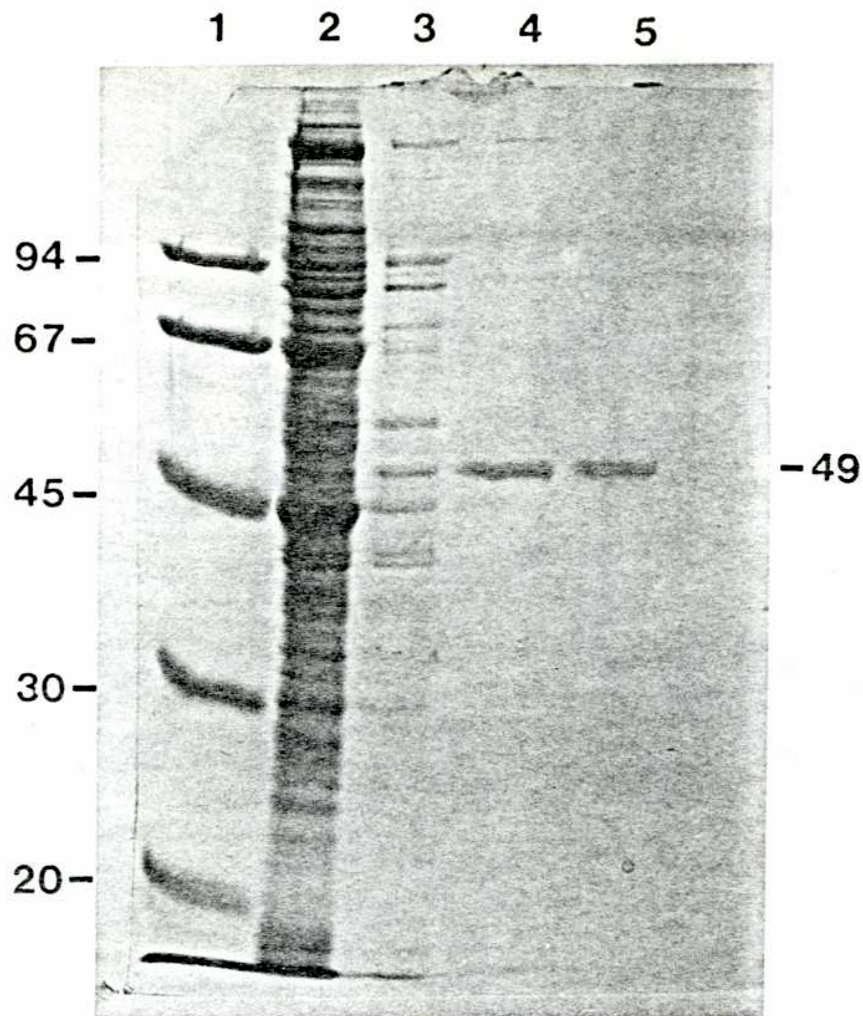


Fig. 9. Comparación de la movilidad electroforética de la CK-EIP y la CK-BB. Canal 1, marcadores de peso molecular (Fosforilasa b, 94000; Albúmina Sérica, 67000; Ovoalbúmina, 45000; Anhidrasa Carbónica, 30000; Inhibidor de Tripsina de poroto de soja, 20000). Canal 2, Citosol de la purificación de la PrI de útero de rata prepúber (Ref. 139). Canal 3, mezcla de las fracciones con actividad de CK eluidas de la columna de DEAE-Sephacel de la purificación de la PrI (Ref. 139). Canal 4, la PrI eluída de la columna de Hidroxiapatita Ultrogel (ref. 139). Canal 5, la CK-BB eluída de la columna de Hidroxiapatita de la purificación de la CK-BB de cerebro de rata prepúber.

III- Estudios Inmunológicos Comparativos de la Inmunoreactividad de la CK-EIP y la CK-BB

Para llevar a cabo los estudios inmunológicos se disponía de antisuero de conejo contra la CK-EIP. Se produjo entonces antisuero de conejo contra la CK-BB (ver 2) y se purificaron las IgG de ambos inmunosueros por columna de Proteína A-Sepharosa (ver 3).

Se realizaron estudios comparativos de la reactividad de la CK-EIP y la CK-BB frente a las IgG purificadas, Anti CK-EIP y Anti CK-BB, utilizando enzimoimmunoensayo en portaobjeto (ver 16) e inmunodifusión bidimensional (ver 4).

III.1- Enzimoimmunoensayo en Portaobjeto (SIA)

Se utilizó ¹lug de la CK-EIP o la CK-BB por círculo y como primer anticuerpo se utilizaron las IgG purificadas (1mg/ml), Anti CK-BB y Anti CK-EIP, en las diluciones indicadas en la Tabla 3 donde se presentan los resultados.

Tabla 3

Análisis de la Inmunoreactividad de la CK-EIP y
la CK-BB por Enzimoimmunoensayo en Portaobjeto (SIA)

Anticuerpo	Antígenos	
	Absorbancia a 410nm	
	CK-EIP	CK-BB
Anti CK-BB		
Dilucion		
1:100	1.02	0.95
1:1000	0.51	0.43
1:10000	0.09	0.03
Anti CK-EIP		
Dilucion		
1:100	1.02	0.49
1:1000	0.46	0.06
1:10000	0.00	0.00

Ambos anticuerpos Anti CK-EIP y Anti CK-BB reaccionaron con la CK-EIP con igual intensidad, sin embargo el anticuerpo contra la CK-EIP mostró mayor afinidad por la CK-EIP que por la CK-BB.

III.2- Inmunodifusión Bidimensional (Ouchterlony)

Para encontrar las concentraciones que permitieron visualizar las bandas de precipitación se utilizaron dos Ouchterlony (ver 4) en cuyos círculos se podía sembrar hasta 20ul y se enfrentaron 15ug de CK-EIP en el círculo central de una de las Ouchterlony y 15ug de CK-BB en el círculo central de la otra, contra diferentes cantidades de IgG purificada de conejo contra la CK-EIP y contra la CK-BB (ver 3) respectivamente, según el siguiente esquema:

Círculo Nro	IgG(ug)
1	10
2	15
3	30
4	45
5	70
6	100

No se observaron bandas de precipitación resultantes de la interacción entre la CK-BB e IgG contra la CK-BB.

Las bandas de precipitación resultantes de la interacción entre la CK-EIP y Anti CK-EIP se muestran en la Fig. 10. Se obtuvo una banda de precipitación adecuada entre 15ug de la CK-EIP y 45 a 70ug de Anti CK-EIP.

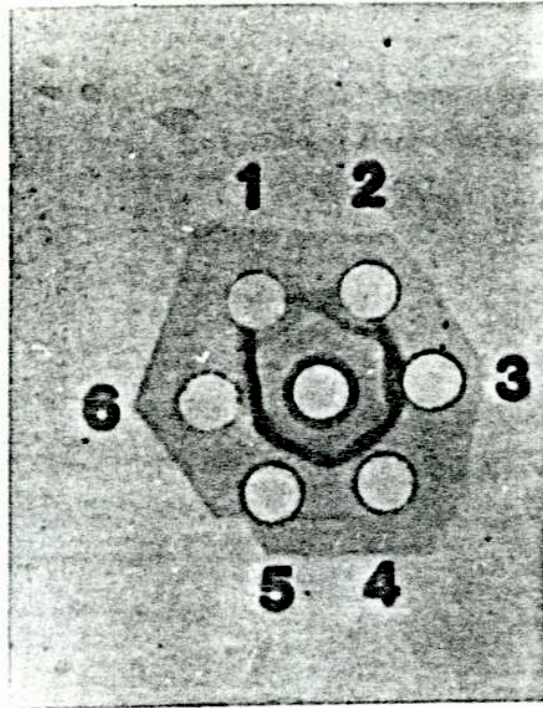


Fig. 10. Inmunodifusión Bidimensional. En el círculo central se sembró 15ug de la CK-EIP. En los círculos 1, 2, 3, 4, 5 y 6, se sembraron 10, 15, 30, 45, 70 y 100ug de IgG de conejo contra la CK-EIP (Anti CK-EIP) respectivamente. Se visualiza una banda de precipitación adecuada en intensidad y posición entre 15ug de la CK-EIP y 45 a 70ug de Anti CK-EIP.

El siguiente paso fue comprobar si la CK-BB precipitaba con IgG contra CK-EIP. Para ello se utilizaron dos Ouchterlony en cuyos círculos podía sembrarse hasta 10ul (ver 4) y se enfrentaron 14.3ug de la CK-BB en el círculo central de una de las Ouchterlony y 18ug de la CK-EIP en el círculo central de la otra, con diferentes cantidades de Anti CK-EIP según el siguiente esquema:

Círculo Nro	Anti CK-EIP(ug)
1	5
2	10
3	15
4	20

Como se observa en la Fig. 11A se obtuvieron bandas de precipitación entre la CK-BB y Anti CK-EIP pero de menor intensidad que las obtenidas entre la CK-EIP y Anti CK-EIP (Fig. 11B). Se obtuvieron bandas de intensidad comparable utilizando aproximadamente el doble de cantidad de la CK-BB con respecto a la CK-EIP.

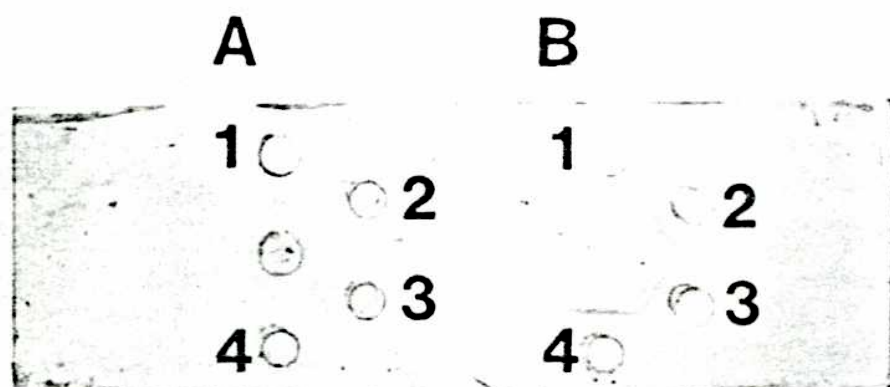


Fig. 11. Inmunodifusión Bidimensional. En los círculos 1, 2, 3 y 4 se sembraron 5, 10, 15 y 20ug de IgG de conejo contra la CK-EIP (Anti CK-EIP) respectivamente. (A) En el círculo central se sembró 14.3ug de la CK-BB. (B) En el círculo central se sembró 18ug de la CK-EIP.

Se observan bandas entre CK-BB y Anti CK-EIP (A) de menor intensidad que entre CK-EIP y Anti CK-EIP (B).

Para analizar el tipo de identidad existente entre la CK-EIP y la CK-BB se diagramó el esquema de sembrado presentado en la Fig. 12A y se preparó una Ouchterlony de mayor tamaño que permitió el sembrado de la cantidad de proteína requerida para obtener las bandas adecuadas. Para ello se utilizó un vidrio de 8 x 8 cm enmarcado con tela adhesiva en el que se depositó 25ml de agar 1%, los pozos se marcaron con cilindros metálicos y se retiró el agar por succión, produciendo pozos en los que se sembró hasta 30ul por vez. La CK-EIP sembrada presentaba 1580cpm de ^3H y 157cpm de ^{14}C por ug. Se sembró con el siguiente esquema:

Círculo Nro	Anti CK-EIP(ug)	CK-BB(ug)	CK-EIP(ug)
1			36
2	60		
3		70	
4	60		
5	75		
6	45		

Se observa en la Fig. 12:

- A- La disposición de los círculos sembrados
- B- Bandas de precipitación teñidas
- C- Bandas de precipitación sin teñir
- D- Autoradiografía

La banda de precipitación formada entre la CK-BB y Anti CK-EIP (Fig. 12 B y C, círculos 2 y 3) se une totalmente a la banda de precipitación formada entre la CK-EIP y Anti CK-EIP (Círculos 1 y 2), mientras que esta última banda muestra un alargamiento (espolon) que indica la presencia de uno o más epitopes en la CK-EIP que no están presentes en la CK-BB, es una reacción de identidad parcial. La autoradiografía (ver 4) muestra que las bandas 1 y 2, 1 y 5, y 1 y 6 (Fig. 12 D) son radioactivas.

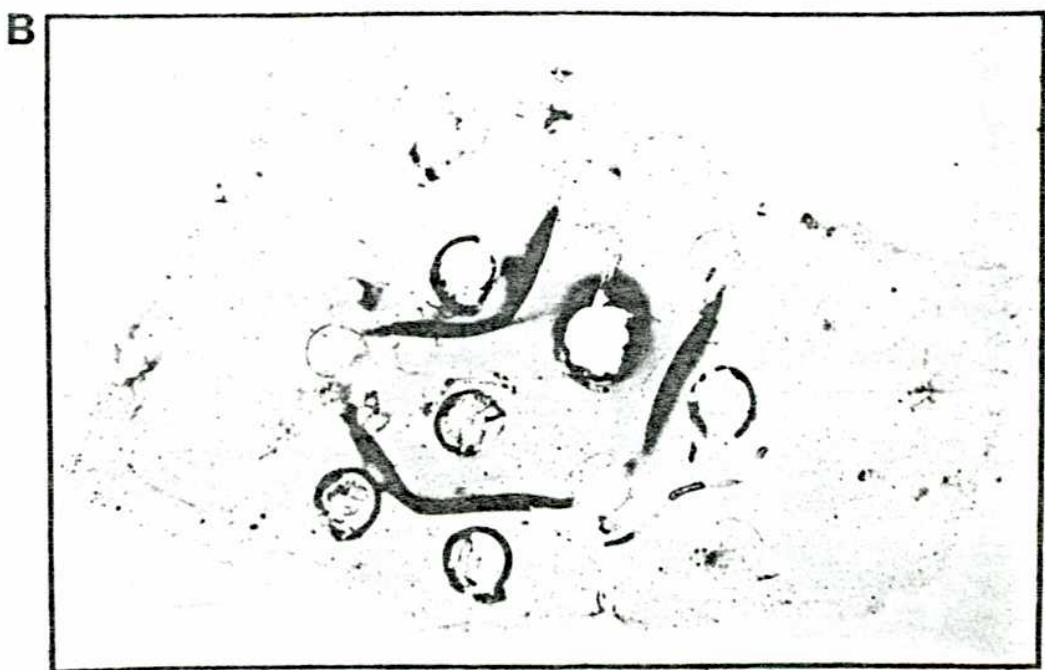
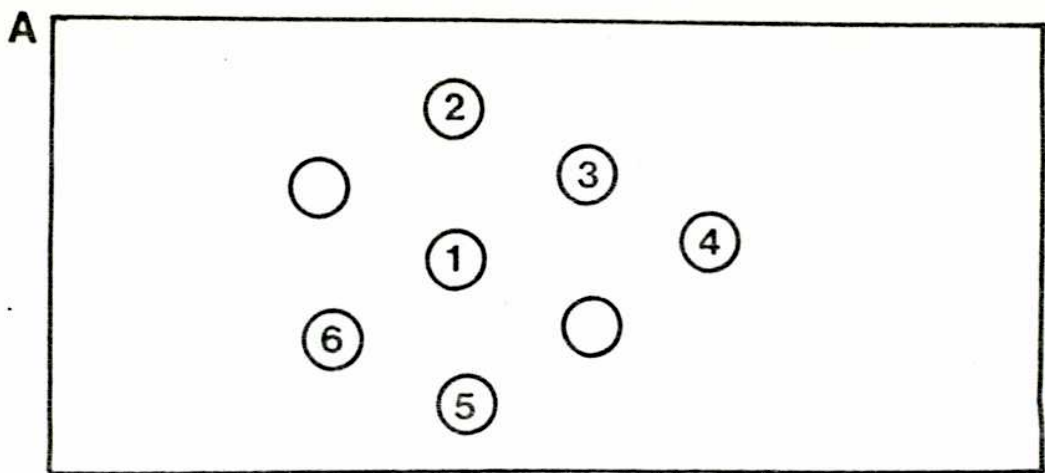


Fig. 12A. Inmunodifusión Bidimensional. Disposición de los círculos sembrados: 1: 36ug de la CK-EIP, 2: 60ug de Anti CK-EIP, 3: 70ug de la CK-BB, 4: 60ug de Anti CK-EIP, 5: 75ug de Anti CK-EIP, 6: 45ug de Anti CK-EIP.

Fig. 12B. Se sembraron la CK-EIP, la CK-BB y Anti CK-EIP en las concentraciones y con la disposición detalladas en la Fig. 12A. Se observan las bandas de precipitación teñidas con Coomasie Brilliant Blue. El espolón de la banda de precipitación entre la CK-EIP (pozo 1) y Anti CK-EIP (pozo 2) que se separa de la banda de precipitación entre la CK-BB (pozo 3) y Anti CK-EIP (pozo 2) indica una reacción de identidad parcial.

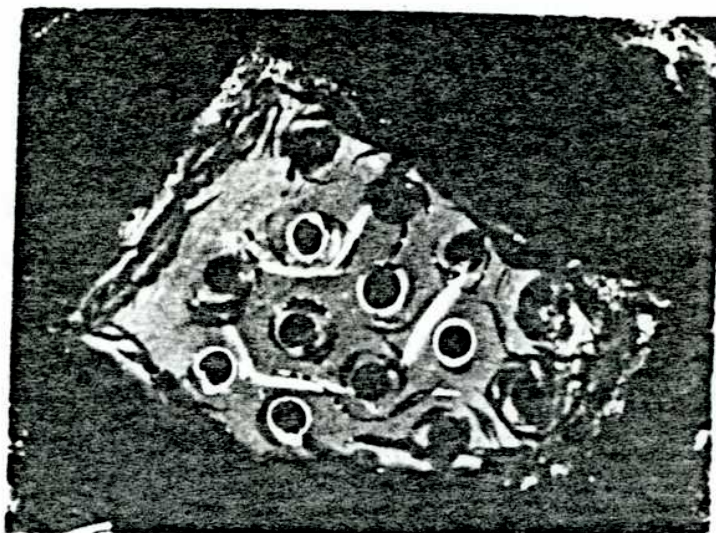


Fig. 12C. Inmunodifusión Bidimensional. Se sembraron la CK-EIP, la CK-BB y Anti CK-EIP en la concentración y disposición detalladas en la Fig. 12A. Se observan las bandas de precipitación sin teñir. El espolón de la banda de precipitación entre la CK-EIP (pozo 1) y Anti CK-EIP (pozo 2) que se separa de la banda de precipitación entre la CK-BB (pozo 3) y Anti CK-EIP (pozo 2) indica una reacción de identidad parcial.



Fig. 12D. Inmunodifusión Bidimensional: autoradiografía. Se sembraron la CK-EIP, la CK-BB y Anti CK-EIP en la concentración y disposición detalladas en la Fig. 12A. Luego de obtenidas las bandas de precipitación, la Ouchterlony se secó a temperatura ambiente, se roció con EN³HANCE Spray y se autoradiografió con película Kodak X-Omat AR a -80°C. Se observan las bandas radioactivas entre los círculos 1 y 2, 1 y 5 y entre 1 y 6 correspondientes a la precipitación de la CK-EIP. El espolón formado por la reacción de identidad parcial entre la CK-EIP, la CK-BB y Anti CK-EIP, que se visualiza en las Fig. 12B y 12C presenta radioactividad (banda entre los pozos 1 y 2).

IV- Comparación de Propiedades Químicas
y Fisicoquímicas de la CK-EIP y la CK-BB

IV.1- Isoelectroenfocado

Se utilizaron 0.75ml de Anfolitos pH 3.5-5 y 2.25ml de Anfolitos pH 5-8 para la preparación de un PAGIEF (ver 7). Se sembró 20ug de la CK-EIP en el canal 2, una mezcla de 20ug de la CK-EIP y 20ug de la CK-BB en el canal 3 y 20ug de la CK-BB en el canal 4. En la Fig. 13 se observa en los canales 1 y 5 los patrones de punto isoelectrónico, en el canal 2 una banda gruesa y un chorreado no enfocado, en el canal 3 una banda perfectamente enfocada, una banda gruesa y un chorreado no enfocado y en el canal 4 una banda perfectamente enfocada. Los puntos isoelectrónicos fueron calculados de acuerdo a los puntos isoelectrónicos de los marcadores, siendo el pI de la CK-EIP de 4.5 y el de la CK-BB de 4.8.

Se preparó otro PAGIEF con 1.25ml de Anfolitos pH 3.5-5 y 1.75ml de Anfolitos pH 5-8. Se sembró 20ug de la CK-BB en el canal 2 y 20ug de la CK-EIP en el canal 3. Se observa en la Fig. 14, en los canales 1 y 4 los patrones de punto isoelectrónico, en el canal 2 una banda gruesa, un chorreado y bandas menores, y en el canal 3 una banda perfectamente enfocada y bandas menores. Los puntos isoelectrónicos fueron calculados de acuerdo al gradiente de pH medido en el gel. El pI presentado por la CK-EIP fue de 4.4 y el de la CK-BB de 5.0.

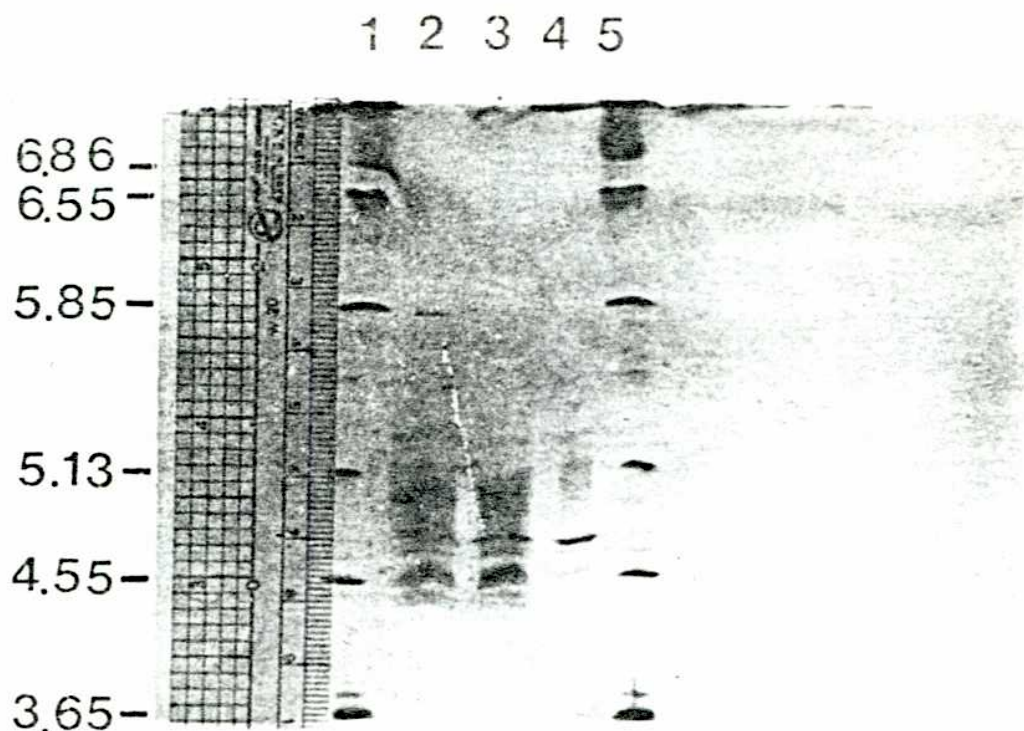


Fig. 13. Isoelectroenfocado de la CK-EIP y la CK-BB en gel de Poliacrilamida (PAGIEF). En los canales 1 y 5 los marcadores de punto isoelectrico (Amiloglucosidasa de *Aspergillus*, 3.65; Inhibidor de Tripsina de poroto de soja, 4.55; B-Lactoalbumina (A) de leche bovina, 5.13; Anhidrasa Carbonica B de eritrocitos bovinos, 5.85; Mioglobina porcina, 6.55 y Mioglobina Trifluoracetilada equina, 6.86). En el canal 2, 20ug de CK-EIP. En el canal 3, 20ug de la CK-EIP y 20ug de la CK-BB. En el canal 4, 20ug de la CK-BB.

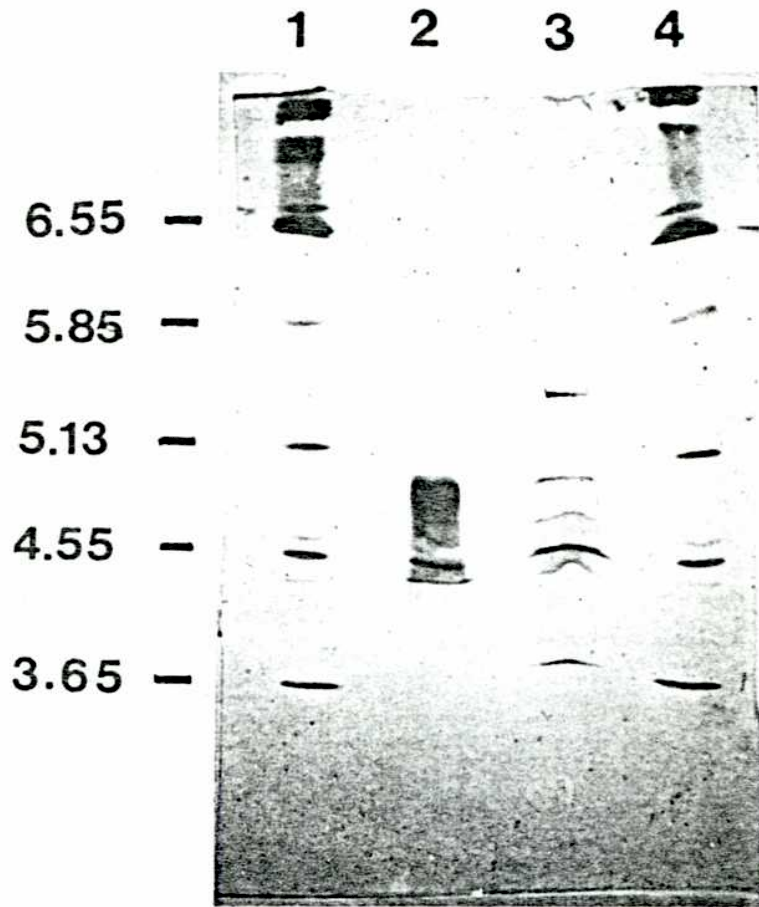


Fig. 14. Isoelectroenfocado de la CK-EIP y la CK-BB en gel de Poliacrilamida (PAGE). En los canales 1 y 4 los marcadores de punto isoelectrico (Amiloglucosidasa de *Aspergillus*, 3.65; Inhibidor de Tripsina de poroto de soja, 4.55; B-Lactoalbumina (A) de leche bovina, 5.13; Anhidrase Carbonica B de eritrocitos bovinos, 5.85; Mioglobina porcina, 6.55 y Mioglobina Trifluoracetilada equina, 6.86). En el canal 2, 20ug de la CK-BB. En el canal 3, 20ug de la CK-EIP.

IV.2- Digestiones Químicas

IV.2.1- Digestion con Acido Fórmico 88%

Se digirieron 100ug de la CK-EIP y la CK-BB respectivamente en 200ul de HCOOH 88%, durante 24hs a 37°C. La digestión fue parada por congelamiento a -80°C. La muestras se liofilizaron y se analizaron en PAGE-SDS (ver 12).

En la Fig. 15 se observa el perfil electroforético en PAGE-SDS al 15% de la digestión de la CK-EIP en el canal 1 y de la digestión de la CK-BB en el canal 2, mostrando dos bandas intensas y varias bandas menores en ambas digestiones con un perfil idéntico.

La digestión de ambas proteínas fue repetida en las mismas condiciones y el perfil electroforético en PAGE-SDS al 15% de las digestiones de ambas proteínas fue analizado por densitometría (ver 12).

En la Fig. 16A se observa la densitometría del gel corrido con la digestión de la CK-BB y en la Fig. 16B la densitometría del gel corrido con la digestión de la CK-EIP, mostrando ambas un perfil idéntico.

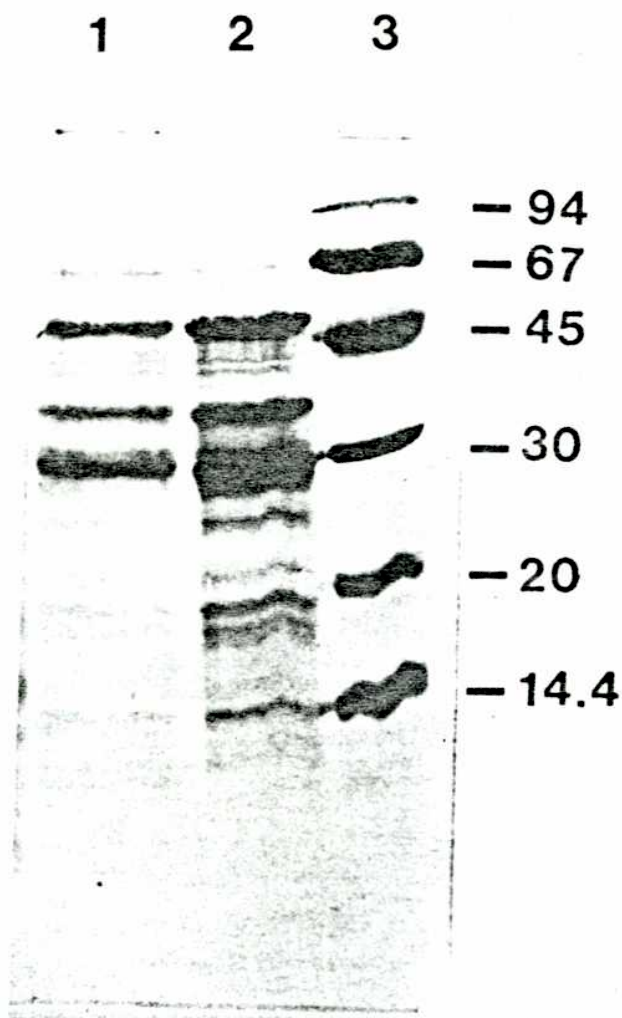


Fig. 15. Análisis, en PAGE-SDS 15% de los productos de las digestiones químicas de la CK-EIP y la CK-BB con HCOOH 88%. En el canal 3, marcadores de peso molecular (Fosforilasa b, 94000; Albúmina Sérica, 67000; Ovoalbúmina, 45000; Anhidrasa Carbónica, 30000; Inhibidor de Tripsina de poroto de soja, 20000 y α -Lactoalbumina, 14400). En el canal 1, los péptidos de la digestión de 20ug de la CK-EIP. En el canal 2, los péptidos de la digestión de 20ug de la CK-BB.

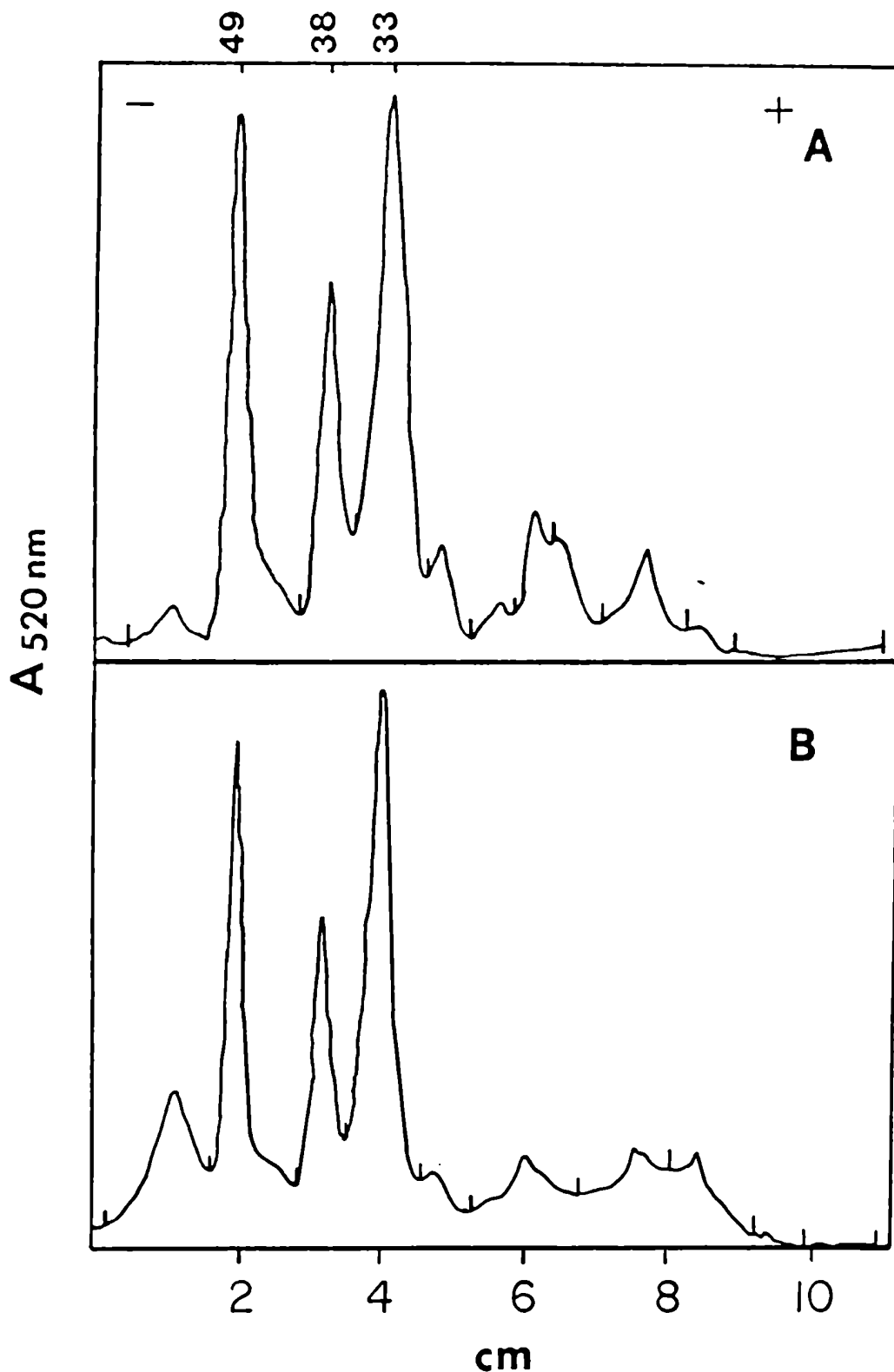


Fig. 16. Análisis densitométrico del PAGE-SDS 15% de los productos de las digestiones químicas de la CK-EIP y la CK-BB con HCOOH 88%. (A) Densitometría del canal del PAGE-SDS donde se corrieron los productos de la digestión de 20ug de la CK-BB. (B) Densitometría del canal del PAGE-SDS donde se corrieron los productos de la digestión de 20ug de la CK-EIP.

IV.2.2- Digestiones con Acido Clorhídrico y
Bromuro de Cianógeno en Acido Clorhídrico

Para poner a punto las condiciones a utilizar se llevaron a cabo las siguientes digestiones de la CK-BB:

Se resuspendieron 40, 65 y 140 ug de la CK-BB liofilizados en 100ul de una solución de 1.8mg de BrCN por ml de ClH 0.1N. Se dejó digerir a temperatura ambiente por 24hs, se neutralizó con NaOH 0.1N, se liofilizó y analizó en PAGE-SDS 10x (ver 12).

Se observa en la Fig. 17 el perfil electroforético en PAGE-SDS, en el canal 1 se sembró 40ug de la CK-BB control, en los canales 2, 4 y 5 las digestiones de los 65, 40 y 140ug de la CK-BB respectivamente y en el canal 3 los patrones de PM (ver 12).

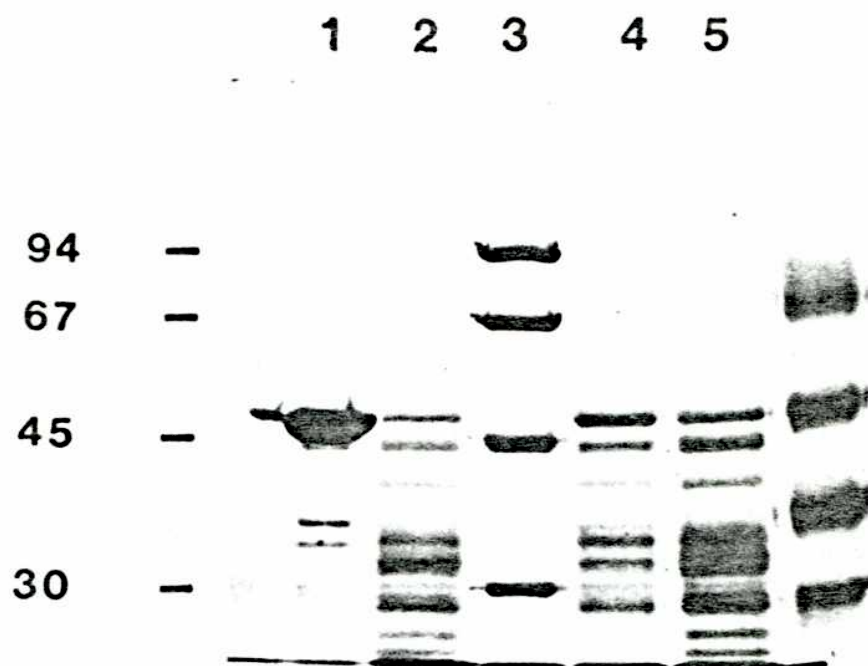


Fig. 17. Análisis en PAGE-SDS 10% de los productos de la digestión química de la CK-BB con BrCN (1.8mg/ml) en ClH 0.1N. Canal 1, 40ug de la CK-BB. Canales 2, 4 y 5 los productos de las digestiones de 65, 40 y 140ug de la CK-BB respectivamente. Canal 3, los marcadores de peso molecular (Fosforilasa b, 94000; Albúmina Sérica, 67000; Ovalbúmina, 45000; Anhidrasa Carbónica, 30000).

Para realizar el estudio comparativo entre la CK-EIP y la CK-BB se utilizó 100ug de proteína llevándose adelante el siguiente protocolo:

100ug de la CK-EIP y de la CK-BB liofilizadas fueron resuspendidos en 70ul de NP-40 0.1% y se agregaron 125ul de una solución de 1.8mg de BrCN por ml de ClH 0.1N respectivamente. Para ver el efecto del ClH sobre ambas proteínas se resuspendió 20ug de cada una en 40ul de NP-40 y se agregó 25ul de ClH 0.1N respectivamente. Se dejó digerir por 24hs a temperatura ambiente, se neutralizó con NaOH 0.1N, liofilizó y analizó en PAGE-SDS 15%.

Se observa en la Fig. 18 el perfil electroforético en PAGE-SDS, en los canales 1 y 6 los patrones de PM (ver 12), en los canales 2 y 5 el efecto del ClH sobre la CK-EIP y la CK-BB respectivamente y en los canales 3 y 4 los productos de la digestión con BrCN de la CK-EIP y la CK-BB respectivamente. Se visualizan las diferencias en el comportamiento de ambas proteínas frente al ClH 0.04N y frente al BrCN en ClH 0.06N.

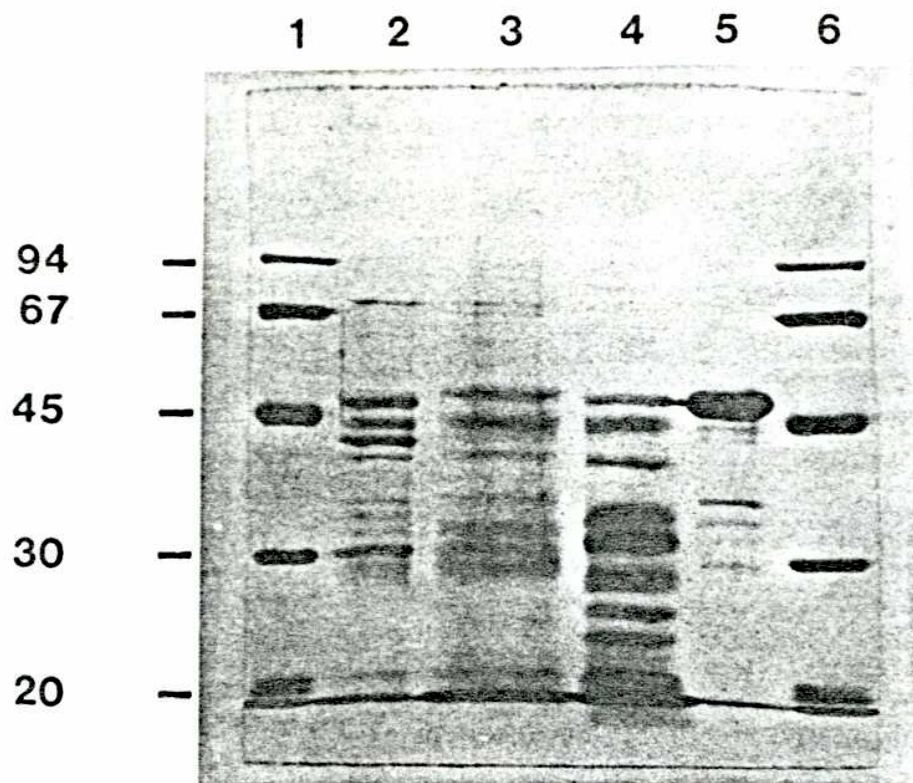


Fig. 18. Análisis en PAGE-SDS 10% de los productos de las digestiones químicas de la CK-BB y la CK-EIP con ClH 0.04N y con BrCN (1.8mg/ml) en ClH 0.06N. Canales 1 y 6, los marcadores de peso molecular (Fosforilasa b, 94000; Albúmina Sérica, 67000; Ovalbúmina, 45000; Anhidrasa Carbónica, 30000; Inhibidor de Tripsina de poroto de soja, 20000). Canal 2, productos de la digestión de la CK-EIP con ClH 0.04N, Canal 3, productos de la digestión de la CK-EIP con BrCN. Canal 4, productos de la digestión de la CK-BB con BrCN. Canal 5, productos de la digestión de la CK-BB con ClH 0.04N.

IV.2.3- Digestiones con Acido Fórmico 70%
y Bromuro de Cianógeno en Acido Fórmico 70%

Para poner a punto las condiciones a utilizar se llevaron a cabo las siguientes digestiones con la CK-BB:

-Se prepararon dos tubos con 100ug de la CK-BB liofilizada en cada uno y se resuspendieron en 100ul de una solución de 1.5mg de BrCN por ml de HCOOH 70%.

-Se prepararon dos tubos con 100ug de la CK-BB liofilizada en cada uno y se resuspendieron en 100ul de una solución de 15.0mg de BrCN por ml de HCOOH 70%.

Se dejó digerir un tubo de cada una de las preparaciones por 24hs a temperatura ambiente y en oscuridad. Los otros dos tubos se mantuvieron a temperatura ambiente por 24hs en presencia de luz. Se paró la digestión por congelamiento a -80°C. Se liofilizó y sembró en PAGE-SDS 15x (ver 12).

En la Fig. 19 se observa el perfil electroforético, en los canales 1 y 6 los patrones de PM (ver 12), en los canales 2 y 3 la digestión de la CK-BB con la solución de 1.5mg de BrCN a la luz y en oscuridad respectivamente y en los canales 4 y 5 la digestión de la CK-BB con la solución de 15.0mg de BrCN a la luz

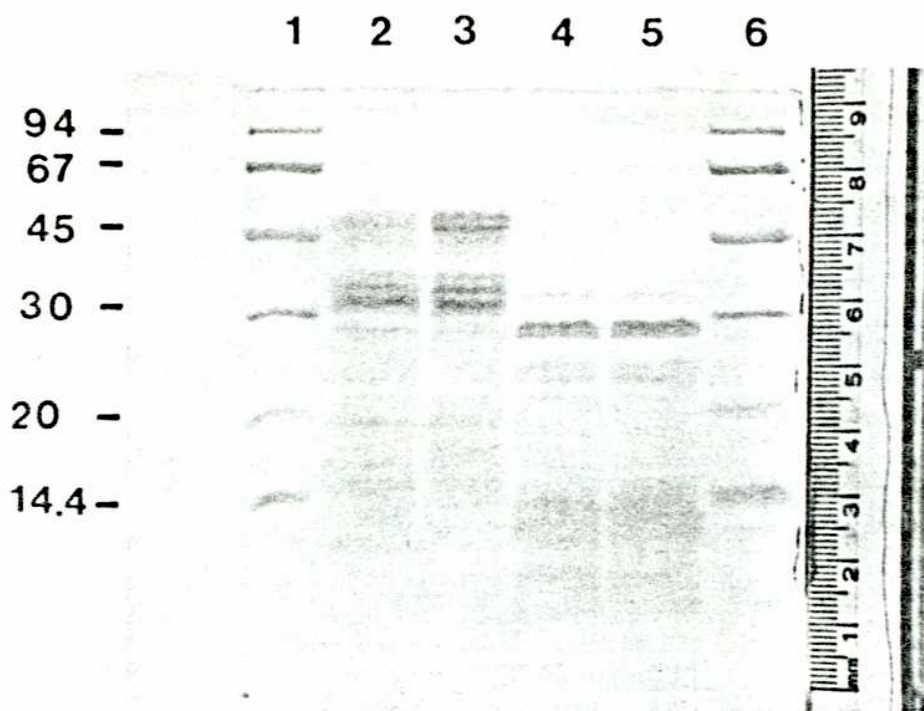


Fig. 19. Análisis en PAGE-SDS 15% de los productos de las digestiones químicas de la CK-BB con BrCN en HCOOH 70%. Canales 1 y 6, los marcadores de peso molecular (Fosforilasa b, 94000; Albúmina Sérica, 67000; Ovalbúmina, 45000; Anhidrasa Carbónica, 30000; Inhibidor de Tripsina de poroto de soja, 20000; α -Lactoalbumina, 14400). Canales 2 y 3, productos de las digestiones de la CK-BB con BrCN (1,5mg/ml) llevadas a cabo en presencia de luz y en oscuridad respectivamente. Canales 4 y 5, productos de las digestiones de la CK-BB con BrCN (15.0mg/ml) llevadas a cabo en presencia de luz y en oscuridad respectivamente.

y en oscuridad respectivamente. Se visualiza que no hay diferencia en las digestiones por la presencia de la luz y que se logró una digestión de toda la proteína utilizada en presencia de la solución más concentrada de BrCN pues esta ausente la banda de peso molecular 49000 (canales 4 y 5).

Para el estudio comparativo de la CK-EIP y la CK-BB se llevó adelante el siguiente protocolo:

Se resuspendieron 100ug de la CK-EIP y de la CK-BB en 250ul de una solución de 15.0mg de BrCN por ml de HCOOH 70%, NP-40 0.1% respectivamente. Para ver el efecto del HCOOH sobre ambas proteínas se resuspendieron 20ug de cada una en 50ul de HCOOH 70%, NP-40 0.1%. Se dejó digerir por 24hs a temperatura ambiente y se paró la digestión por congelamiento a -80°C. Se liofilizó y sembró en PAGE-SDS 15% (ver 12).

Se observa el perfil electroforético en la Fig. 20, en los canales 1 y 6 los patrones de PM (ver 12), en los canales 2 y 5 el efecto del HCOOH 70% sobre la CK-EIP y la CK-BB respectivamente y en los canales 3 y 4 el efecto del BrCN en HCOOH 70% sobre la CK-EIP y la CK-BB respectivamente. Se visualiza un comportamiento diferente de ambas proteínas frente al HCOOH 70%, y un perfil idéntico con BrCN en HCOOH 70%.

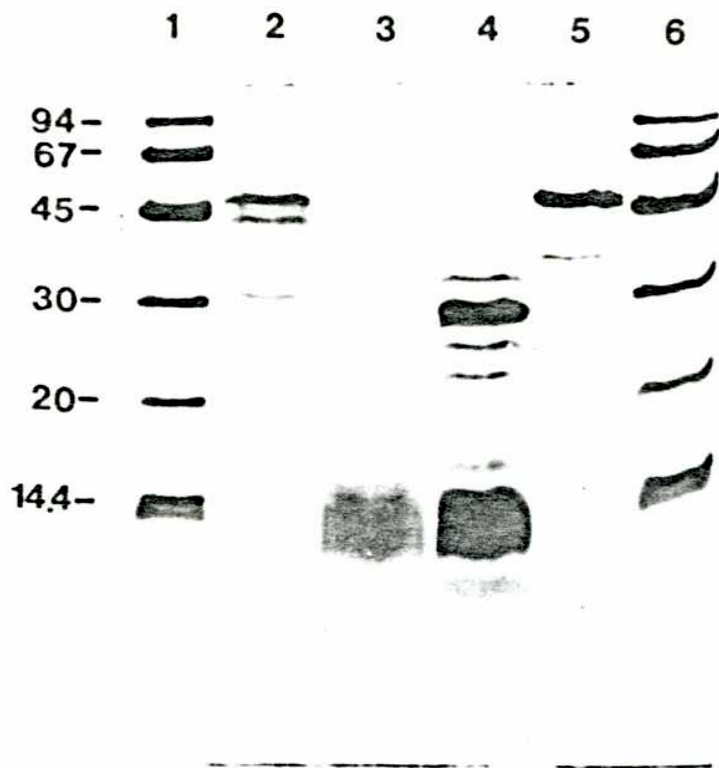


Fig. 20. Análisis en PAGE-SDS 15% de los productos de las digestiones químicas de la CK-BB y la CK-EIP con HCOOH 70% y con BrCN (15mg/ml) en HCOOH 70%. Canales 1 y 6, los marcadores de peso molecular (Fosforilasa b, 94000; Albúmina Sérica, 67000; Ovalbúmina, 45000; Anhidrasa Carbónica, 30000; Inhibidor de Tripsina de poroto de soja, 20000; α -Lactoalbumina, 14400). Canales 2 y 5, productos de las digestiones de la CK-EIP y la CK-BB con HCOOH 70% respectivamente. Canales 3 y 4, productos de las digestiones de la CK-EIP y la CK-BB con BrCN en HCOOH 70% respectivamente.

IV.3- Digestiones Enzimáticas

IV.3.1- Digestión con Tripsina

La CK-EIP y la CK-BB fueron digeridas en idénticas condiciones con Tripsina (ver 6.1) y los péptidos producto de la digestión se analizaron por cromatografía de alta presión (ver 15).

En la Fig. 21A se observa en el cromatograma de la digestión de la CK-BB con Tripsina un pico a 63.94' que no se halla presente en el cromatograma de la CK-EIP (Fig. 21B).

IV.3.2- Digestión con Clostripain

Se digirieron 50ug de la CK-EIP y 65ug de la CK-BB con Clostripain en idénticas condiciones (ver 6.3) y se analizaron los péptidos producto de la digestión por cromatografía de alta presión (ver 15).

En la Fig. 22 se observan los cromatogramas de la digestión de la CK-BB (A) y de la CK-EIP (B) con Clostripain.

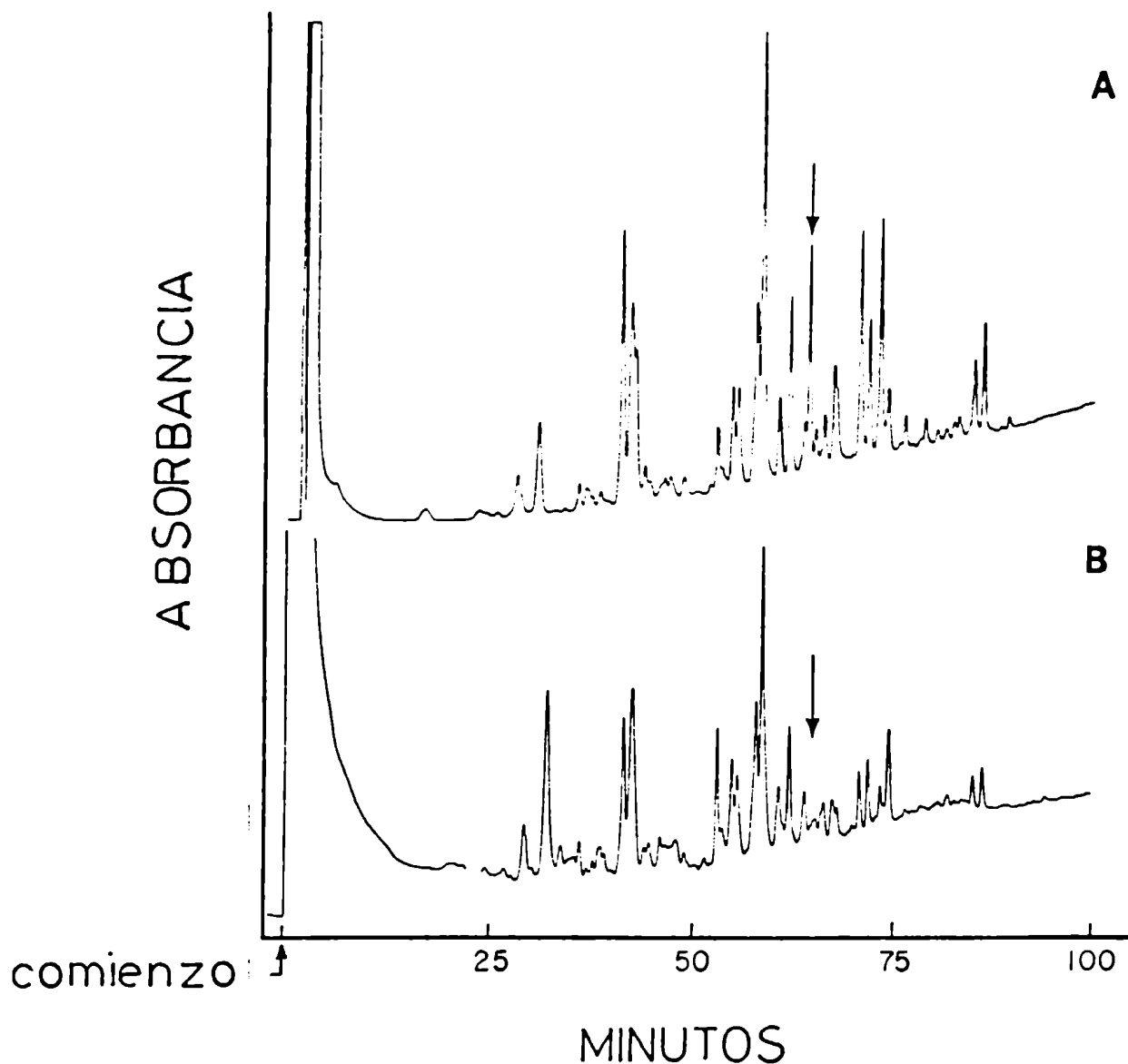


Fig. 21. Análisis por HPLC en fase reversa de los productos de las digestiones enzimáticas de la CK-BB (Cromatograma (A)) y de la CK-EIP (Cromatograma (B)) con Tripsina. Las corridas se llevaron a cabo en una columna Aquapor Octyl RP-300 utilizando como solvente A: 0.1% de $F_3C-COOH$ y como solvente B: 90% de H_3C-CN , 0.1% $F_3C-COOH$ produciendo un gradiente lineal de 0 a 60% de B en 60 min a 0.6ml/min. La absorbancia se registro a 229nm.

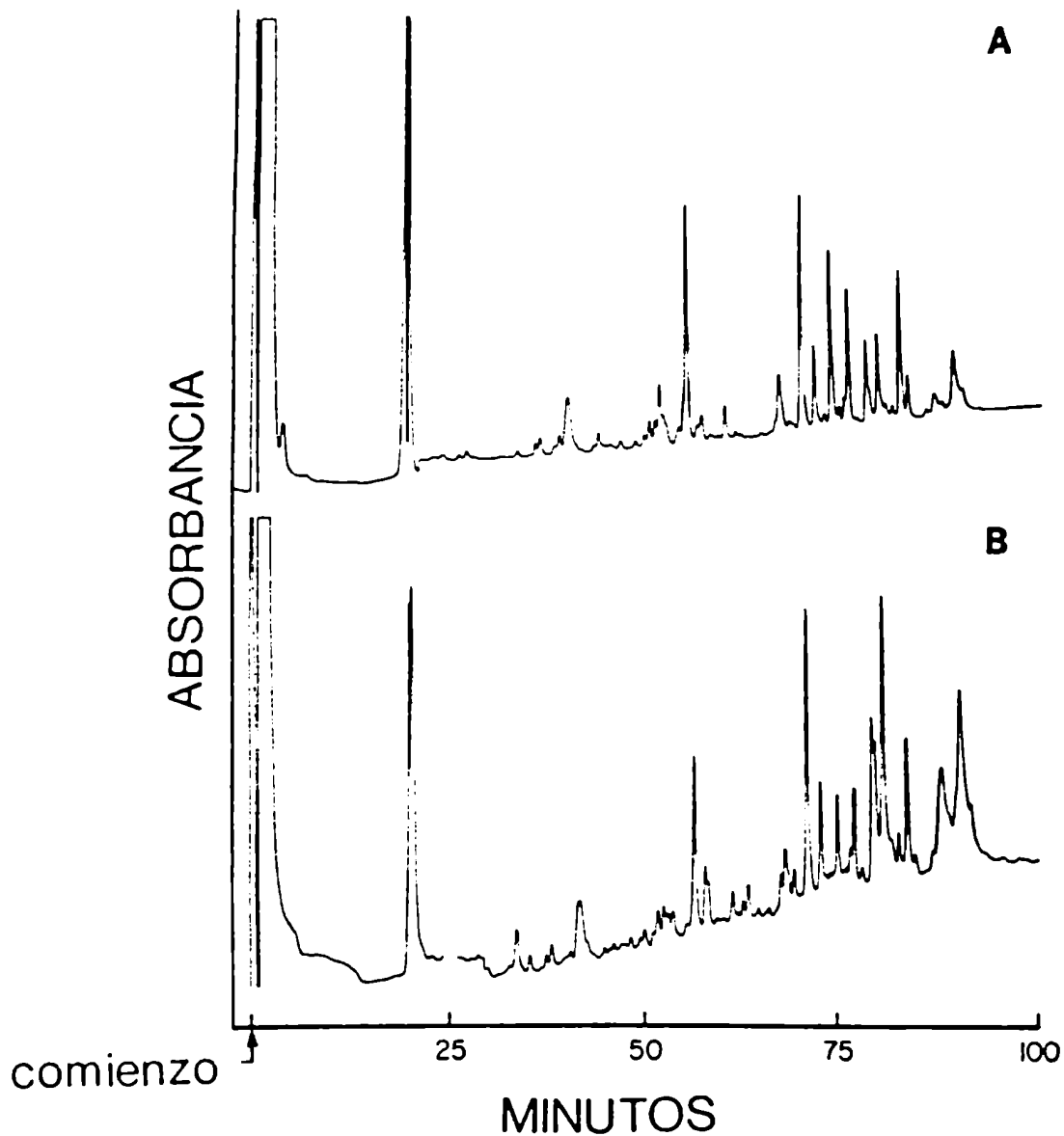


Fig. 22. Analisis por HPLC en fase reversa de los productos de las digestiones enzimaticas de la CK-BB (Cromatograma (A)) y de la CK-EIP (Cromatograma (B)) con Clostripain. Las corridas se llevaron a cabo en una columna Aquapor Octyl RP-300 utilizando como solvente A: 0.1% de $F_3C-COOH$ y como solvente B: 90% de H_3C-CN , 0.1% $F_3C-COOH$ produciendo un gradiente lineal de 0 a 60% de B en 60min a 0.6ml/min. La absorbancia se registro a 229nm.

Si bien las áreas relativas de los picos son diferentes, los picos mayores presentan un perfil idéntico en ambos cromatogramas.

IV.3.3- Digestión con Quimotripsina

Se digirieron la CK-EIP y la CK-BB en idénticas condiciones con Quimotripsina (ver 6.2) y se analizaron los péptidos producto de la digestión por cromatografía de alta presión (ver 15).

En la Fig. - 23A se observa en el cromatograma de la digestión de la CK-BB con Quimotripsina un pico menor a 22.80' que se halla ausente en el cromatograma de la CK-EIP (Fig. 23B). Todos los picos mayores son idénticos en ambos cromatogramas.

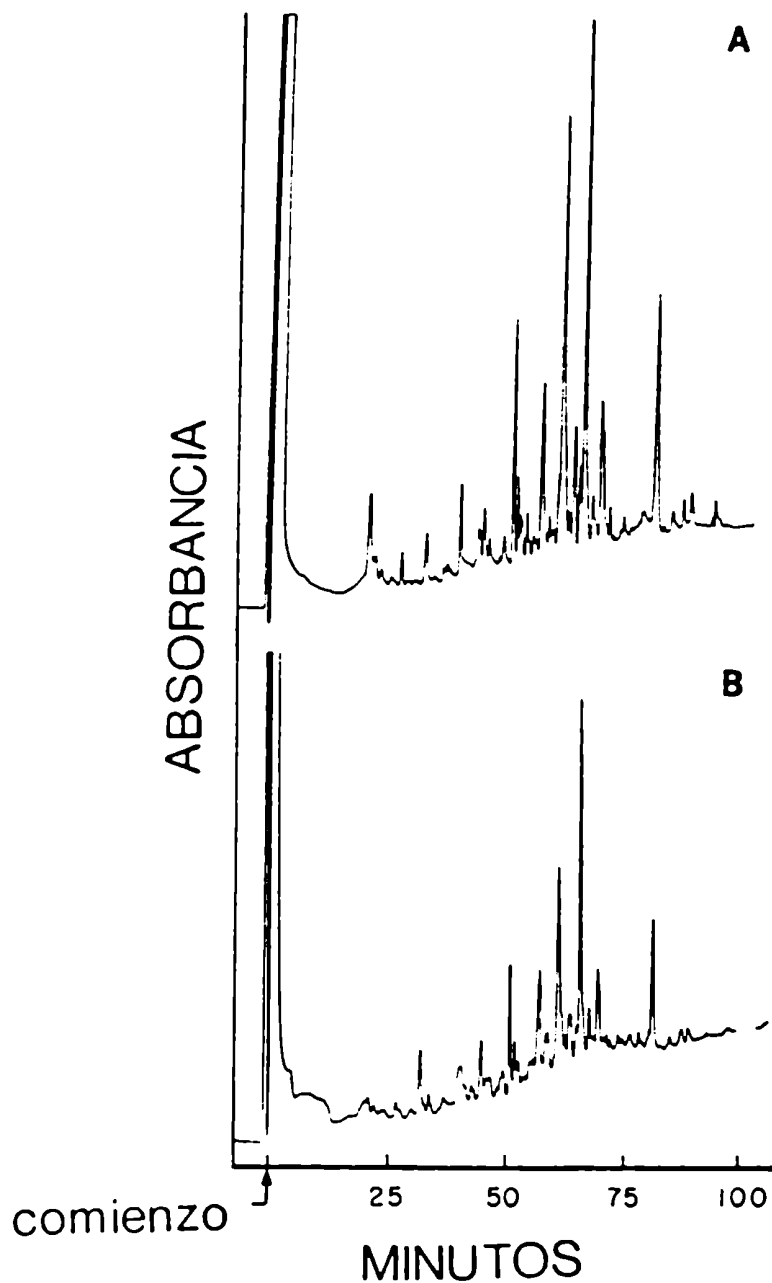


Fig. 23. Analisis por HPLC en fase reversa de los productos de las digestiones enzimaticas de la CK-BB (Cromatograma (A)) y de la CK-EIP (Cromatograma (B)) con Quimotripsina. Las corridas se llevaron a cabo en una columna Aquapor Octyl RP-300 utilizando como solvente A: 0.1% de $F_3C-COOH$ y como solvente B: 90% de H_3C-CN , 0.1% $F_3C-COOH$ produciendo un gradiente lineal de 0 a 60% de B en 60min a 0.6ml/min. La absorbancia se registro' a 229nm.

V- Aislamiento del ARN-m de Creatina Quinasa Inducida
por Estrógeno (CK-EIP) en Utero de Rata Prepúber

El ARN-m de la Creatina Quinasa inducida por estrógeno en útero de rata prepúber se halla en baja proporción con respecto a la cantidad total de ARN-m. Parcial purificación del mismo fue lograda mediante la detección de incorporación diferencial en la marcación radioactiva de los productos de la traducción in vitro del ARN-m obtenido de útero de rata prepúber y de útero de rata prepúber inducida por estrógeno. Se confirmó que el polipeptido que se diferenciaba era también producto de la traducción in vitro del ARN-m de rata adulta. El ARN-m de la CK-EIP fue parcialmente purificado en un gradiente de Sacarosa.

V.1- Obtencion del ARN-m poli A+

Se llevaron a cabo varias preparaciones de ARN-m de útero de rata prepúber, de rata prepúber inducida por estrógeno y de rata adulta.

V.1.1- Obtencion de ARN-m poli A+ de Utero de
Ratas Prepúberes

Se utilizaron los úteros de 95 ratas prepúberes (18 a 21 días de vida) extraídos una hora después de ser inyectadas intraperitonealmente con 300ul de solución fisiológica al 1% en Etanol. Los úteros pesaron 1.74g (0.018g de peso por útero). Se obtuvo 2.23mg de ARN total utilizando el método de ClCs/Isotiocianato de Guanidina (ver 8.1).

Se cromatografió 1.12mg del ARN total en Oligo(dT)-Celulosa (ver 8.2) y se obtuvo 60ug de ARN-m (ARN-m de primera elución), en 4ml que se llevaron a 0.5M en ClLi. Se calentó a 65°C y se sembró en la columna previamente equilibrada con el buffer de sembrado. Se recogieron fracciones de 0.5ml (20ml en total) en las que la A₂₆₀ era cero, luego se eluyó con el buffer de elución y se recuperó 29ug (48.3%) de los 60ug sembrados (ARN-m de segunda elución). Se tomaron alícuotas con 9ug de ARN-m de primera elución y 9ug del ARN-m de segunda elución a las que se agregó 2.5 y 5ug de ARN-t respectivamente, Acetato de Sodio 0.1M concentración final y 2.2 volúmenes de etanol, se dejó precipitar por 2hs a -20°C, se centrifugó a 8000 rpm por 1h y se resuspendieron los precipitados en 3ul de H₂O. Los eluidos de ARN-m de primera y segunda elución fueron cromatografiados en gel de agarosa al 1%.

En la Fig. 24A se observa en la corrida cromatográfica en gel de agarosa al 1% (ver 11): en el canal 1 los fragmentos de restricción obtenidos de la digestión del ADN del Bacteriofago Lambda cepa CI ts 857 Sam 7 con BamHI a 68°C por 10min:16841, 7233, 6770, 6527, 5626 y 5505 pares de bases, en el canal 2 el ARN-t utilizado en la precipitación de bajas cantidades de ARN-m, en el canal 3 y 4 se sembró 1 µg de los 2.23mg de ARN total obtenido del útero de las ratas prepúberes y en el canal 5 los patrones de peso molecular de ARN-r 16S y 23S de E. coli.

En la Fig. 24B se observa la corrida cromatográfica en gel de agarosa al 1% (ver 11) de 3 y 6 µg del ARN-m de primera elución en los canales 1 y 2 respectivamente, de 3 y 6 µg del ARN-m de segunda elución en los canales 3 y 4 respectivamente y de los marcadores de peso molecular 16S y 23S ARN-r de E. coli en el canal 6.

Se aprecia en la Fig. 24B que el perfil electroforético del ARN-m de primera (canales 1 y 2) y de segunda elución (canales 3 y 4) no mostraron diferencia entre sí y que están ausentes las bandas del ARN-r eucariótico 18S y 28S del ARN total (que se muestran en los canales 3 y 4 de la Fig. 24A).

El ARN-m de primera elución no se sembró por segunda vez en la columna de Oligo(dT)-Celulosa pues no se obtuvo mayor pureza

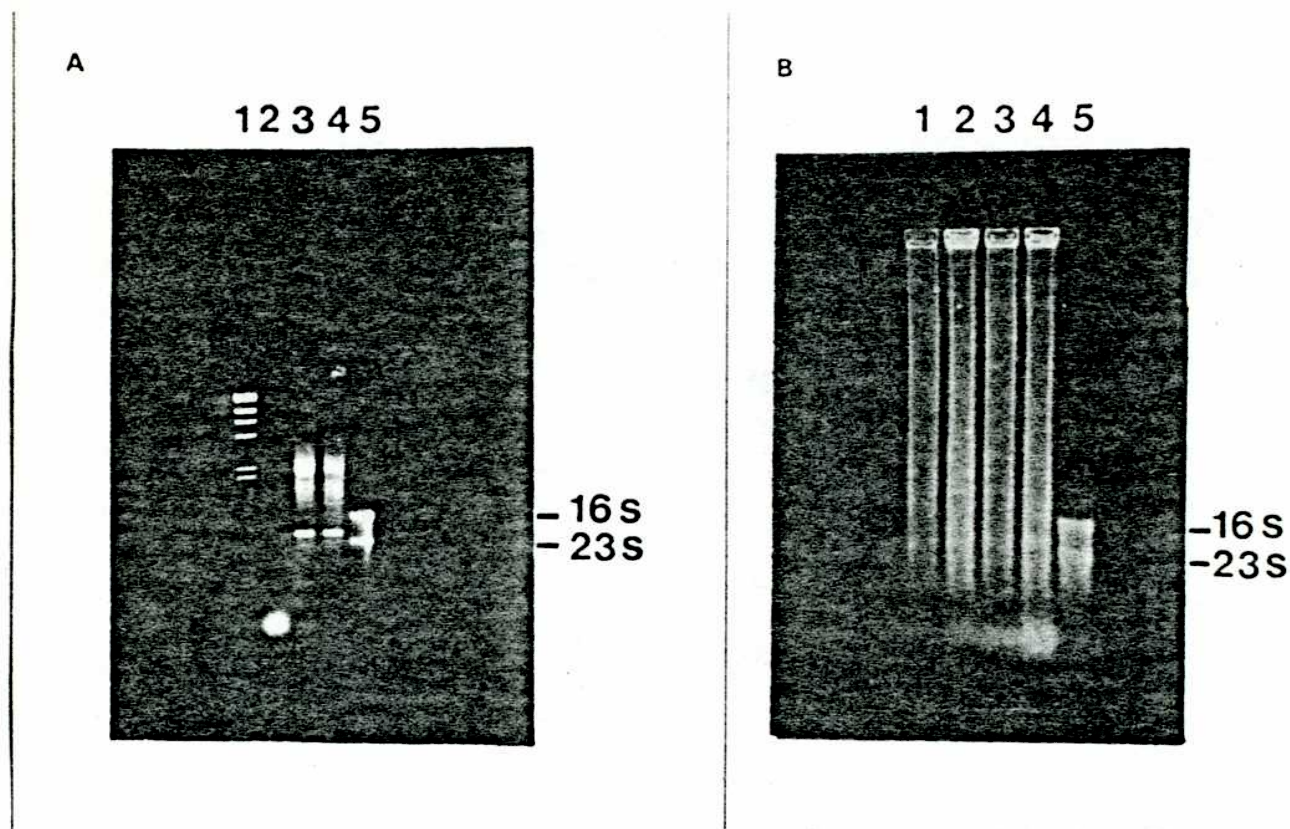


Fig. 24. Análisis por cromatografía en gel de agarosa al 1% del ARN total y ARN-m obtenido de útero de ratas prepúberes. (A) Canal 1, fragmentos de 16841, 7233, 6770, 6527, 5626 y 5505 pares de bases. Canal 2, 3ug de ARN-t. Canales 3 y 4, 1ug de ARN total de útero. Canal 5, marcadores de peso molecular, ARN-r 16S y ARN-r 23S de *E. coli*. (B) Canales 1 y 2, ARN-m de primera elución, 3 y 6 ug respectivamente. Canales 3 y 4, ARN-m de segunda elución, 3 y 6 ug respectivamente. Canal 5, marcadores de peso molecular, ARN-r 16S y ARN-r 23S.

en el ARN-m de segunda elución y se perdió alrededor del 50%.

El resto del ARN total (1.12mg) de útero de rata prepúber fue cromatografiado y se obtuvo 60ug de ARN-m.

V.1.2- Obtención del ARN-m poli A+ de Utero de Ratas Prepúberes Inducidas por Estrógeno

Se utilizaron los úteros de 95 ratas prepúberes (18 a 21 días de vida) extraídos una hora después de ser inyectadas intraperitonealmente con 5ug de 17 β -Estradiol en 300ul de solución fisiológica al 1% en Etanol. Los úteros pesaron 1.92g (0.02g de peso por útero). Se obtuvo 1.76mg de ARN total por el método de ClCs/Isotiocianato (ver 8.1) y 180ug de ARN-m por cromatografía en Oligo(dT)-Celulosa (ver 8.2).

V.1.3- Obtención de ARN-m de Utero de Ratas Adultas

Se utilizaron los úteros de 21 ratas adultas que pesaron 8.6g (0.41g de peso por útero). Se obtuvo el ARN total por el método de ClCs/Isotiocianato (ver 8.1) utilizando un tubo Corex de 125 ml donde se precipitaron las fases acuosas que contenían el ARN. Se centrifugó a 3000rpm durante 13hs, se separó el sobrenadante y se conservó a -20°C. El precipitado fue resuspendido en 1ml del mismo sobrenadante, colocado en un tubo

Eppendorf y centrifugado a 8000 rpm por 1h a -15°C. Se separó el sobrenadante, se dejó drenar el tubo y se redisolvió el precipitado en H₂O. Se obtuvieron 5.5mg de ARN total.

Observando que en el caso del procesamiento de los úteros de ratas prepúberes (ver V.1) se obtuvo 1.28mg de ARN total por gramo de tejido, en el caso del procesamiento de los úteros de ratas prepúberes inducidas por estrógeno (ver V.2) se obtuvo 0.916mg de ARN total por gramo de tejido y en el caso del procesamiento de los úteros de ratas adultas se obtuvo 0.639mg de ARN total por gramo de tejido se decidió controlar si la centrifugación del tubo Corex de 125ml por 13hs a 3000rpm había sido suficiente para bajar todo el ARN. Para ello se tomó parte de dicho sobrenadante en un tubo Corex de 25ml y se centrifugó a 8000 rpm por 1h y efectivamente se obtuvo un precipitado visible que disuelto en H₂O absorbía a 260nm, las condiciones utilizadas en la centrifugación fueron insuficientes para recuperar cuantitativamente el ARN-m.

Se cromatografió en Oligo(dT)-Celulosa los 5.5mg de ARN total de útero de rata adulta y se obtuvo 204ug de ARN-m.

V.2- Traducción in vitro de ARN-m poli A*
de Utero de Rata Prepúber, de Utero de Rata Inducida
con Estrógeno y de Utero de Rata Adulta

La traducción in vitro en lisado de reticulocitos de conejo (ver 10), se llevó a cabo por duplicado utilizando diluciones dobles sucesivas hasta 1/16 del ARN-m partiendo de 2ug/ul (ver 8.2).

Una vez evaluada la incorporación de aminoácido tritiado a proteína por sobre el valor del blanco, se mezclaron los duplicados y se cromatografió en PAGE-SDS. El gel fue teñido, fotografiado y finalmente cortado en segmentos de 2mm que se digirieron con 0.5ml de H₂O₂ al 30% a 80°C. Se agregó Aquasol y se analizó la radioactividad en el canal de Tritio de un contador de centelleo líquido (ver 12).

En la Fig. 25 (Ref. 142) se presenta el perfil radioactivo en PAGE-SDS de los productos de la traducción de los ARN-m de:

-útero de rata adulta (tres meses de vida),

-útero de rata prepúber (18 a 21 días de vida) obtenidos una hora después de ser inyectadas intraperitonealmente con 5ug de

17B-Estradiol en 0.3ml de solución fisiológica al 1% en Etanol y

-útero de rata prepúber obtenidos una hora después de ser

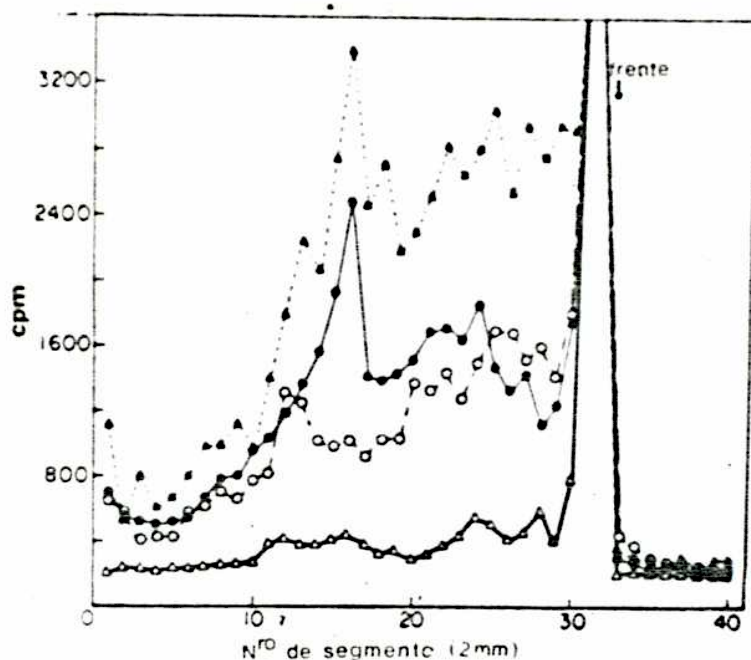


Fig. 25. Analisis por PAGE-SDS 10% de los productos de la traducción in vitro del ARN-m poli A+ de útero de rata adulta y prepúber. ▲-▲, útero de rata adulta (3 meses de vida). ●-●, útero de rata prepúber extraído una hora despues de inyectar intraperitonealmente 5ug de 17 β -Estradiol en 0.3ml de solución fisiológica al 1% de Etanol. ○-○, útero de rata prepúber extraído una hora despues de inyectar intraperitonealmente 0.3ml de solución fisiológica. Δ-Δ, control de la traducción sin agregado de ARN-m poly A+. Se cortó el gel en segmentos de 2mm, se digirió en H₂O₂ y se analizó la radioactividad.

inyectadas intraperitonealmente con 0.3ml de solución fisiológica al 1% en Etanol.

Se observa un pico en el trozo Nro 16 del PAGE-SDS corrido con los productos de la traducción de los ARN-m de útero de ratas adultas o inducidas por estrógeno, que no se hallaba presente en el caso de útero de rata prepúber ni en el blanco de la reacción. El peso molecular de dicho polipeptido osciló entre los 43 y 45 Kd.

Los productos de la traducción in vitro fueron corridos en PAGE-SDS y electrotransferidos a Nitrocelulosa (ver 13). La inmunodetección (ver 14) con Anti CK-BB y Proteína A marcada con ^{125}I (ver 14.2) fue negativa.

V.3- Purificación del ARN-m de CK-EIP por Gradiente de Sacarosa

Se utilizaron 100ug de ARN-m poli A+ de útero de rata obtenidos 1h después de ser inyectadas intraperitonealmente con 0.3ml de solución fisiológica al 1% en Etanol y 100ug de ARN-m poli A+ de útero de rata obtenidos 1h después de ser inyectadas intraperitonealmente con 5ug de 17 β -Estradiol en 300ul de solución fisiológica al 1% en Etanol. Se corrieron en un gradiente de Sacarosa 4 a 20% respectivamente (ver 9). Se obtuvieron 28 tubos por cada uno de los gradientes fraccionados y se numeraron de 1 (4% de Sacarosa) a 28 (20% de Sacarosa). El

ARN fue precipitado luego redisolto en 2ul de H₂O.

Se analizaron todos los precipitados por traducción in vitro en lisados de reticulocitos (ver 10) que fueron luego sembrados en PAGE-SDS (ver 12) y electrotransferidos (ver 13) a Nitrocelulosa. Se utilizó en primera instancia IgG purificada de conejo contra CK-EIP como primer anticuerpo y se reveló con Proteína A marcada con ¹²⁵I (ver 14 y 14.2). Se detectó la presencia de una banda proteica en la corrida del tubo Nro 7 (10% de Sacarosa) del fraccionamiento del gradiente del ARN-m de utero de rata inducida con estrógeno, cuyo peso molecular era muy cercano al de la CK-EIP.

En la Fig. 26 se presenta la autoradiografía de la Nitrocelulosa tratada con IgG contra CK-EIP como primer anticuerpo y revelada con Proteína A marcada con ¹²⁵I, proveniente de la electrotransferencia de la corrida en PAGE-SDS de 2ug de la CK-EIP en el canal 1, de 40ul provenientes de la traducción in vitro del tubo número 7 (10% de Sacarosa) del gradiente de Sacarosa del ARN-m proveniente de útero de ratas inducidas con estrógeno en el canal 2 y de 40ul provenientes de la traducción in vitro del tubo número 7 (10% de Sacarosa) del gradiente de Sacarosa del ARN-m proveniente de ratas prepúberes control en el canal 3. Se observa la presencia de una banda radioactiva, debida al reconocimiento de una cadena polipeptídica de peso molecular muy cercano al de la CK-EIP,

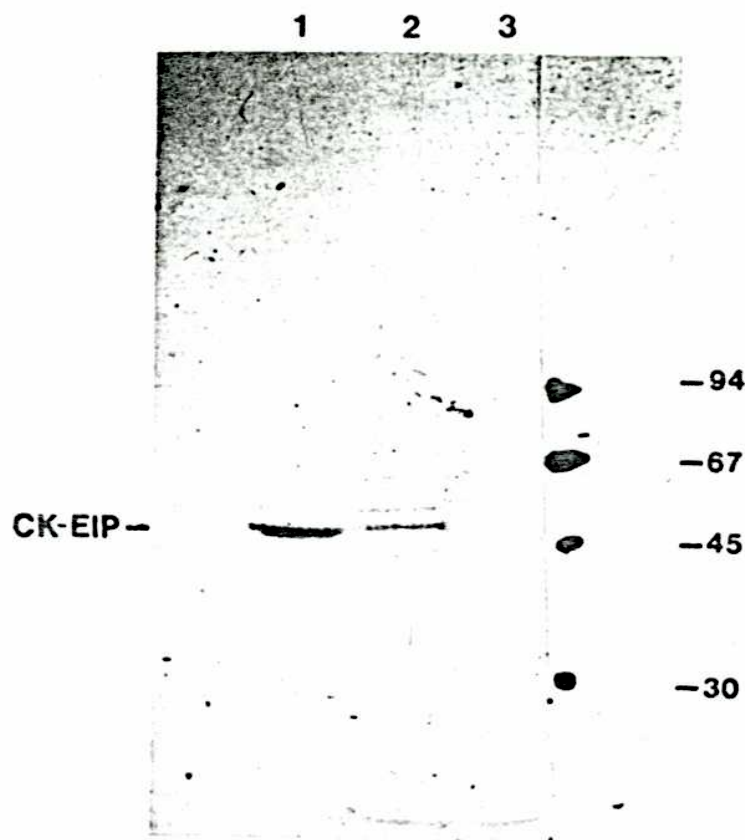


Fig. 26. Análisis por Inmunodetección en Nitrocelulosa de la electrotransferencia del PAGE-SDS de los productos de la traducción in vitro del ARN-m poli A+ de útero de rata purificados por gradiente de Sacarosa. La inmunodetección se llevó a cabo con IgG Anti CK-EIP y Proteína A marcada con ^{125}I . Canal 1, Zug de la CK-EIP. Canal 2, producto de la traducción de ARN-m poli A+ del tubo número 7 (10%) del gradiente de sacarosa (4-20%) del ARN-m poli A+ de útero de rata prepúber inducida con estrógeno. Canal 3, producto de la traducción de ARN-m poli A+ del tubo número 7 del gradiente de sacarosa del ARN-m poli A+ de útero de rata prepúber.

presente en los productos de traducción del ARN-m poli A+ de útero de rata inducida por estrógenos luego de ser fraccionado en un gradiente de Sacarosa (canal 2). Dicha banda no estaba presente en el caso de los ARN-m poli A+ de útero de rata prepúber sin inducir (canal 3).

Se fraccionaron varias preparaciones de ARN-m poli A+, proveniente de utero de ratas prepúberes inducidas con estrógeno y de ratas prepúberes sin inducir, en gradiente de sacarosa y se analizaron los productos de la traducción in vitro de los tubos 6, 7 y 8 de los fraccionamientos utilizando en la inmunodetección IgG de conejo contra CK-BB (ver 14 y 14.2) y el MAb-28AF (ver 14 y 14.3). La banda correspondiente a una cadena polipeptídica de peso molecular muy cercano al de la CK-EIP reaccionó con ambos anticuerpos.

DISCUSION

A- Comportamiento Cromatográfico y Movilidad Electroforética de la CK-EIP y la CK-BB

La gran diferencia de concentración de la PrI en cerebro de rata con respecto a útero de rata (50ug de la PrI obtenidos de 100 úteros de ratas prepúberes (Ref. 139) que pesan aproximadamente 1.9g comparado con 30mg de la CK-BB obtenidos de 210g de cerebro de rata (Ref. 137) que representan aproximadamente 170 cerebros de rata prepuber), hacían del cerebro el organo de elección para la purificación de la PrI.

Reiss y Kaye (Ref. 137) identificaron a la CK-BB de cerebro de rata como el principal componente de la PrI de utero de rata basandose entre otros parametros en el comportamiento cromatográfico de la PrI y de la CK-BB obtenido al suplementar el sobrenadante de un homogenato de cerebro de rata con sobrenadante de un citosol de ratas prepúberes inducidas con estrógeno y marcadas con $[^{35}\text{S}]$ -Metionina. Siguiendo el comportamiento cromatográfico de la CK-BB por su actividad enzimática y el de la PrI por su marcación radioactiva, ambas copurificaban en los sucesivos pasos de purificación.

Se asumió entonces que el esquema de purificación de la PrI de útero de rata prepúber descrito por Kumar y col. (Ref. 139) que se realizaba de rutina en el laboratorio podía utilizarse para obtener la PrI de cerebro de rata prepúber.

La CK-EIP y la CK-BB mostraron el mismo perfil en la cromatografía en DEAE-Sephacel, eluyendo a 0.02M ClNa (Fig. 2A y 6 respectivamente). La cromatografía en Hidroxiapatita Ultrogel (HAU) del pico de actividad de CK obtenido en DEAE-Sephacel en la purificación de la CK-EIP de útero de rata prepúber resolvía en un pico de actividad que eluía a 8mM de fosfato (Fig. 2b) y que analizado en PAGE-SDS mostraba una única banda de peso molecular aparente 49000 (Fig. 3, canal 4). La cromatografía en HAU del pico de actividad de CK obtenido de la columna de DEAE-Sephacel en la purificación de la CK-BB, resolvió en dos picos de actividad de CK, un pico menor que eluía a 16mM de fosfato y un pico mayor que eluía entre 30mM y 60mM de fosfato. Ambos picos analizados en PAGE-SDS mostraron más de una banda si bien la banda principal correspondía al peso molecular aparente de la cadena polipeptídica de la CK-BB.

Las diferentes características cromatográficas de elución de la CK-BB y de la PrI en HAU indicaron la posibilidad de que existiesen diferencias sustanciales entre ambas proteínas. La obtención de dos picos podía deberse a variantes de la isoenzima, o también a que la capacidad de la columna de HAU

fuese baja y teniendo en cuenta que estas columnas presentaban a veces un comportamiento anormal con producción de artefactos se decidió utilizar Hidroxiapatita convencional (HTP).

La purificación de la CK-BB de cerebro de rata prepúber fue puesta a punto sometiendo el homogenato inicial a una cromatografía en DEAE-Sephacel con un gradiente lineal de ClNa (Fig. 6) obteniendo un pico de actividad de CK que eluyó a 0.02M de ClNa (Fig. 6); la cromatografía de dicho pico en HTP utilizando sucesivos gradientes lineales de Fosfato de Potasio 5mM a 500mM, luego 5mM a 200mM y finalmente 5mM a 100mM resolvió en un pico de actividad de CK que eluyó a 18mM de Fosfato (Fig. 7) y que analizado en PAGE-SDS presentó una sola banda de proteína con un peso molecular aparente de 49000 (Fig. 8).

Como se indica en la Tabla 2 (ver Resultados I) de 33.5g de tejido de cerebro de rata prepúber se obtuvieron 3.2mg de proteína con una actividad específica de 459U/mg, con un porcentaje de recuperación del 30% y un grado de purificación de 64.6 veces.

El esquema de purificación de la CK-BB de cerebro de rata utilizado por Reiss y Kaye (Ref. 137) constaba de los siguientes pasos de purificación a partir del homogenato inicial: 1) centrifugación a 27000g (sobrenadante S₂₇), lavado del precipitado, centrifugación y mezcla del sobrenadante del lavado con el S₂₇, 2) fraccionamiento con Sulfato de

Amonio llevando primero al S₂₇ a 40% de saturación, centrifugación a 27000g, separación y ajuste del sobrenadante a 65% y centrifugación, 3) el precipitado así obtenido entre 40 y 65% de saturación era redissuelto en buffer pH 5.2 y la suspensión se centrifugaba a 38000g, el sobrenadante era adicionado con buffer pH 7.9 hasta alcanzar dicho pH y se centrifugaba a 38000g; el sobrenadante que aun era algo turbio se diluía, 4) se cromatografiaba en DEAE-Celulosa con un gradiente discontinuo y luego el pico de actividad de CK obtenido 5) se cromatografiaba diluido en una segunda columna de DEAE-Celulosa con un gradiente lineal, finalmente 6) se cromatografiaba en blue 2-agarosa. A partir de 210g de tejido de cerebro de rata obtenían 30.3mg de proteína con una actividad específica de 560U/mg, con un porcentaje de recuperación del 43% y un grado de purificación de 100 veces.

El método empleado para purificar la CK-BB de cerebro de rata prepuber siguiendo un esquema semejante al usado por Kumar y col. (Ref. 139) para purificar la CK-EIP, con una recuperación de la CK-BB del 30% y un grado de purificación de 64.6 veces, ligeramente menor que la recuperación y purificación lograda por Reiss y Kaye, llevo a la obtención de una única banda proteica en PAGE-SDS mediante un esquema sencillo de purificación por dos cromatografías 1) en DEAE-Sephacel y 2) en HTP.

El peso molecular aparente de la CK-B informado por Reiss y Kaye (Ref. 137) fue de 46000.

Perryman y col. informaron el peso de la subunidad B de la CK-BB purificada de diferentes especies siendo de 44500 la humana, 46000 la canina, 44000 la de conejo y 49000 la de raton (Ref. 155).

El peso molecular aparente de la CK-B de cerebro de rata prepuber es de 49000 y como se aprecia en la Fig. 9 la movilidad electroforética de la CK-EIP es idéntica a la de la CK-BB.

B- Comparación de la Inmunoreactividad de la CK-EIP y la CK-BB

Para llevar a cabo los estudios inmunológicos se disponía de antisuero de conejo contra la CK-EIP, se produjo entonces antisuero contra la CK-BB (ver 2) y se purificaron las IgG de ambos inmunosueros por columna de Proteina A Sepharosa (ver 3). Se realizaron estudios comparativos de las características de unión (inmunoreactividad) de los antígenos (la CK-EIP y la CK-BB) a los anticuerpos (Anti CK-EIP y Anti CK-BB).

B.1- Enzimoinmunoensayo en Portaobjeto (SIA)

La comparación de la inmunoreactividad por SIA (definida como el grado de reconocimiento del Antígeno por el Anticuerpo determinado por la medida de la A_{410}) de la CK-EIP y la CK-BB, mostró (ver III.1, Tabla 3) una neta diferencia de reactividad (aproximadamente 50%) entre Anti CK-EIP y la CK-IP con respecto a Anti CK-EIP y la CK-BB.

Las IgG obtenidas contra la CK-EIP reaccionaron en menor grado con la CK-BB ($A_{410}=0.06$ en dilución 1:1000 y $A_{410}=0.49$ en dilución 1:100) que con la CK-EIP ($A_{410}=0.46$ en dilución 1:1000 y $A_{410}=1.02$ en dilución 1:100).

Teniendo presente que estas proteínas son ampliamente semejantes, determinado por su peso molecular (ver A), su composición aminoacídica (Ref. 139), su función enzimática de CK, su punto isoelectrónico (ver C), sus perfiles de digestiones químicas (ver D) y enzimáticas (ver E) y que la diferencia de reactividad es grande como para deberse a posibles variaciones de afinidad de las moléculas de IgG con respecto a la unión a sus correspondientes epitopes en una de las proteínas con respecto a la otra, podríamos inferir que Anti CK-EIP reconoce epitopes en la CK-EIP que no están presentes en la CK-BB o que están presentes en la CK-BB pero que se repiten en la CK-EIP, por lo tanto la CK-BB es menos reconocida. Esto no excluye que

la CK-BB tenga epitopes propios que no pueden ser reconocidos por Anti CK-EIP pues no estan presentes en la CK-EIP.

Por otro lado Anti CK-BB reconoce a la CK-BB y a la CK-EIP en grado semejante haciendo indistinguibles ambas proteínas. Esto no excluye que la CK-EIP tenga epitopes que no comparta con la CK-BB y por lo tanto no sean detectados por Anti CK-BB, lo que si es probable que excluya es que haya epitopes en la CK-BB que no esten presentes en la CK-EIP.

Tratar de comparar la inunoreactividad de dos anticuerpos (obtenidos contra dos antígenos, la CK-BB y la CK-EIP, probablemente diferentes) contra un antígeno, no es valido ya que se involucraria la 'heterogeneidad' propia de los anticuerpos. Aunque la CK-BB y la CK-EIP fuesen la misma proteina, la respuesta inmune de cada animal aún siendo de la misma cepa podria ser diferente y llevar a conclusiones erroneas. Por ello la diferencia de reactividad entre la CK-BB y Anti CK-BB con respecto a la CK-BB y Anti CK-EIP no es considerada válida para la comparación de ambas proteínas.

Es claro que dos proteínas supuestamente idénticas no pueden reaccionar en forma netamente diferente frente al anticuerpo obtenido contra una de ellas. Anti CK-EIP distinguía estas dos proteínas y fue utilizado para caracterizar la inunoreactividad de ambas por inmunodifusión bidimensional.

B.2- Inmunodifusión Bidimensional (Ouchterlony)

Ouchterlony (Ref. 173) trabajando con un sistema de tres componentes formado por dos antígenos y un anticuerpo que difundían en un gel cada uno desde un pozo, definió cuatro perfiles generales de inmunoreactividad caracterizados por la extensión de las áreas de precipitación desde el sitio inicial entre los pozos hasta el área central. Durante dicha extensión cambios en la regularidad de las líneas de precipitación pueden ocurrir si hay relaciones entre los antígenos que resultan en la interacción de las líneas de precipitación.

Para comparar la inmunoreactividad de la CK-EIP y la CK-BB mediante esta técnica se debió primeramente encontrar la relación y las cantidades adecuadas para la visualización de las líneas de precipitación. Para ello diferentes cantidades de Anti CK-EIP fueron enfrentadas con una determinada cantidad de la CK-EIP y la relación adecuada para la obtención de una banda de precipitación aproximadamente ubicada entre ambos pozos, fue de 15ug de la CK-EIP y de 45 a 70ug de Anti CK-EIP (Fig. 10). Cuando 15ug de la CK-BB fueron enfrentados a diferentes cantidades de Anti CK-BB no se visualizaron bandas de precipitación. Sin embargo 15ug de la CK-BB producían una banda de precipitación con Anti CK-EIP aunque de mucha menor intensidad que la producida entre 15ug de la CK-EIP y Anti CK-EIP (Fig. 11). Se obtuvieron bandas de intensidad comparables cuando se enfrentaron 15ug de la CK-EIP o 30 ug de

la CK-BB contra Anti CK-EIP o sea utilizando el doble de cantidad de la CK-BB con respecto a la CK-EIP.

En el análisis de la inmunoreactividad por SIA, Anti CK-EIP inmunoreaccionó con la CK-BB un 50% menos que con la CK-EIP y en el análisis por Ouchterlony para visualizar bandas de precipitación de intensidad semejante la CK-BB tuvo que utilizarse al doble en cantidad con respecto a la CK-EIP.

Como se observa en la Fig. 12, la CK-BB y la CK-EIP mostraron una inmunoreactividad caracterizada como 'reacción de identidad parcial' o 'parcial fusión de líneas'. El espolón en el arco de precipitación entre la CK-EIP y Anti CK-EIP, que se separa del arco entre la CK-BB y Anti CK-EIP corresponde a la precipitación causada por los epitopes propios de la CK-EIP que no son compartidos por la CK-BB. Dicho espolón también mostro estar marcado radioactivamente, ya que la CK-EIP es una proteína inducida por estrógeno en útero de rata prepúber que se obtiene marcada radioactivamente por la técnica de doble marcación isotópica (Ref. 139). Los 36 ug de la CK-EIP usados en esta Ouchterlony presentaban 56880cpm de ^3H y 5752cpm de ^{14}C . La visualización del espolón por autoradiografía es la confirmación de que la proteína precipitada que no comparte epitopes con la CK-BB, esta marcada. Esto es muy importante ya que si dicho espolón no estuviese marcado sería un contaminante pues la CK-EIP esta marcada, y la probabilidad de tener un contaminante que haya copurificado con la CK-EIP a través de la

purificación por dos columnas cromatográficas y que además haya sido inducido por estrógeno (ya que la relación $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ de la preparación es alta) es aún mas baja que la de tener un contaminante no radioactivo.

C- Comparacion del Punto Isoeléctrico de la CK-EIP y la CK-BB

Una simple observacion determinó que la CK-EIP era mas ácida que la CK-BB. Cuando estas proteínas se utilizaban en SIA, se depositaba lug de las mismas en el portaobjeto y luego se bloqueaban los sitios libres con medio CM. Este medio contiene un indicador de pH, Rojo de Fenol, que vira entre 6.8 (amarillo) y 8.2 (rojo). El medio CM preparado a pH 7.2-7.4 presenta un color rosado. Cuando se depositaba el medio CM sobre la CK-EIP y la CK-BB, solamente en el círculo correspondiente a la CK-EIP el color rosado del medio variaba a un color con tinte naranja-amarillento. Esto no sucedía con la CK-BB.

Los pI de la CK-EIP y la CK-BB fueron determinados por isoelectroenfocado en gel de poliacrilamida.

Se observa en la Fig. 13 que la CK-BB ha enfocado perfectamente y su pI corresponde a 4.8 (canal 4). Si bien la CK-EIP se presenta como una banda difusa (canal 2) se aprecia

una zona mas concentrada a pI 4.5 al igual que en el canal 3 donde fueron corridas ambas proteínas.

En el PAGIEF presentado en la Fig. 14 la CK-EIP enfoco perfectamente a pI 4.4 y presentó bandas menores (canal 3) y la CK-BB si bien presentó una banda difusa, se aprecia una zona mas concentrada a pI 5.0 (canal 2).

La CK-EIP y la CK-BB difieren en punto isoeléctrico: el pI de la CK-EIP es 4.45 y el pI de la CK-BB es 4.9.

D- Comparación de las Digestiones Químicas de la CK-EIP y la CK-BB

La particular labilidad de la unión entre residuos aspartil y prolil en proteínas fue notado por primera vez cuando se realizaba el análisis de la estructura primaria de proteínas que contenían este tipo de uniones. El tratamiento de proteínas en condiciones ácidas suaves, HCOOH 70%, ClH pH2, generalmente por un tiempo de exposición no mayor de 48hs y temperaturas menores de 40°C provoca la ruptura de las uniones peptídicas entre el residuo aspartil y el siguiente aminoácido (Ref. 190) con alta probabilidad de que el siguiente aminoácido sea un residuo prolil (Ref. 175).

La CK-EIP y la CK-BB fueron sometidas a hidrólisis ácida en HCOOH 70% y en ClH 0.04N por 24hs a temperatura ambiente.

Como se observa en la Fig. 20, canal 2, la digestión de la CK-EIP con HCOOH 70% produjo la ruptura de por lo menos tres uniones produciendo péptidos de 44000, 38000 y 33000 (para la ubicación de los péptidos se hace referencia a su peso relativo a los pesos moleculares de los marcadores). La CK-BB (canal 5), bajo las mismas condiciones produjo por lo menos dos péptidos, de 38000 y 33000 de peso molecular relativo. El péptido de 44000 estaba ausente.

Condiciones mas fuertes de hidrólisis en HCOOH 88% por 24hs a 37°C, produjo el mismo número de péptidos en ambas proteínas como se aprecia en el PAGE-SDS de la Fig. 15 y en los perfiles densitométricos de la Fig. 16. Principalmente la ruptura de dos uniones produjeron péptidos de peso molecular relativo de 38000 y 31000 aproximadamente.

Las digestiones de la CK-EIP y la CK-BB en HCOOH 70% diferenciaron ambas proteínas en un péptido de 44000 de peso molecular relativo, presente en la digestión de la CK-EIP y ausente en la digestión de la CK-BB (Fig. 20, canales 2 y 5 respectivamente).

La secuencia aminoacídica de la CK-B fue informada por

Benfield y col. (Ref. 191), deducida del ADN copia obtenido del rastreo con anticuerpos de una biblioteca en λ gt11 preparada con copias del ARN poli A+ obtenido de cerebro de rata. Del estudio de las uniones peptídicas Asp-Pro de dicha secuencia se pueden deducir los posibles péptidos a obtener por el tratamiento de la CK-BB en medio ácido suave y, corresponden aproximadamente, los que se visualizarían en PAGE-SDS a 16000 (que puede ser cortado en una unión Asp-Pro produciendo dos péptidos de 11000 y 5000 respectivamente, que no pueden ser visualizados en el gel), 33000 y 38000 de peso molecular. Ahora bien, los fragmentos de 33000 y 38000 coinciden con los péptidos obtenidos al tratar la CK-BB con HCOOH 70% y además son los dos péptidos más abundantes al digerir la CK-BB con HCOOH 88% (Fig. 15).

La CK-EIP produjo al ser tratada con HCOOH 70% un péptido más que los que produjo la CK-BB y correspondió a un peso molecular relativo de 47000. Al estudiar las zonas aminoacídicas de la CK-BB que corresponden a los posibles cortes que producirían un fragmento de ese tamaño (probables cortes en la zona N-terminal y en la zona C-terminal), no hay presente ninguna unión Asp-Pro, ni tampoco ninguna unión Asn-Pro que pudiera haberse convertido en Asp-Pro al sufrir una deaminación durante el proceso de purificación.

Por lo tanto hay una diferencia en la CK-EIP, a nivel de su secuencia aminoacídica, con respecto a la CK-BB y es probable

que sea una union Asp-Pro o Asp-X en la CK-EIP que no se encuentre presente en la correspondiente posición en la CK-BB.

Como se observa en la Fig. 18, canal 5, la CK-BB no fue afectada por la hidrólisis en ClH, mientras que la CK-EIP sufrió la ruptura de por lo menos tres uniones, correspondiendo a péptidos de peso molecular relativo de 47000, 45000 y 32000 (Fig. 18, canal 2).

El tratamiento de la CK-BB y la CK-EIP con ClH 0.04N mostró una diferencia notable entre ambas proteínas, sin embargo es difícil deducir la relacion existente entre ellas ya que este tratamiento no afectó las uniones Asp-Pro de la CK-BB aunque sí afectó uniones probablemente del tipo Asp-X en la CK-EIP.

La digestión con BrCN bajo condiciones ácidas suaves lleva a la ruptura de las uniones Met-X (Ref. 176). Cuando la CK-EIP y la CK-BB fueron sometidas a digestión con BrCN 1000M en exceso, en HCOOH 70% se obtuvo el mismo número de péptidos, como se observa en la Fig. 21 (canales 3 y 4 respectivamente).

Cuando la CK-EIP y la CK-BB fueron sometidas a digestión con BrCN 100M en exceso, en ClH 0.06N, se obtuvo un mayor numero de péptidos en la digestión de la CK-BB y como se observa en la Fig. 18, canales 3 y 4 respectivamente, en la zona de peso molecular 20000 a 30000, no se encuentran fragmentos de la digestión de la CK-EIP cuando se visualizan por lo menos tres

péptidos en la CK-BB. El análisis de estos resultados en relación a la secuencia aminoacídica de la CK-BB lleva a demasiadas combinaciones de posibles péptidos producidos y partimos de la base de que el mismo ClH 0.04N donde se realizó la digestión con BrCN produjo cortes en la CK-EIP, cuya secuencia no poseemos, y no produjo cortes en la CK-BB.

La digestión con BrCN 100M en ClH 0.06N produjo péptidos en la CK-EIP diferentes a los producidos en la CK-BB.

E- Comparación de las Digestiones Enzimáticas de la CK-EIP y la CK-BB

Hay muchos métodos para el corte de uniones aminoacídicas específicas en una proteína desnaturalizada. Para el corte de proteínas en péptidos de un largo promedio de 10 residuos, (dependiendo del contenido en Lisina y Arginina en la proteína) el método mas específico usado es la digestión con Tripsina. Otras proteasas frecuentemente usadas son: Quimotripsina, Pepsina, Termolisina, Papaina y Subtilisina, en orden aproximadamente decreciente de especificidad. Estas ultimas proteasas son generalmente usadas para la digestión secundaria de péptidos largos obtenidos de la digestión primaria de proteínas con BrCN o con Tripsina, ya que la baja especificidad de las mismas produce complejas mezclas si son usadas sobre la proteína entera.

La CK-BB y la CK-EIP fueron sometidas a digestión con Tripsina, Clostripain y Quimotripsina y los peptidos obtenidos fueron analizados por cromatografía de alta presión en fase reversa.

La Tripsina cataliza la hidrólisis de las uniones Lys-X y Arg-X, excepto cuando el residuo X es Prolina, aunque un corte mas lento de estas uniones puede ser observado. La velocidad de corte varia considerablemente, las uniones Arg-X son cortadas generalmente mas rapidamente que las uniones Lys-X y la presencia de residuos ácidos en cualquiera de los lados del residuo básico reduce la velocidad significativamente.

Al someter la CK-BB y la CK-EIP a digestión con Tripsina se obtuvo un pico mayor a 63.94' presente en la digestión de la CK-BB (Fig. 21A) y ausente en la digestión de la CK-EIP (Fig. 21B). También se produjo una variación en la concentración relativa de ciertos fragmentos que pudo deberse a una diferencia en el entorno aminoacídico de las uniones peptídicas cortadas.

Una union del tipo Lys-X o Arg-X esta presente en la CK-BB y ausente en la CK-EIP en la correspondiente posición.

Con la idea de distinguir cual de las dos uniones era la causante de la aparición del peptido a 63.94' se utilizó la

proteasa Clostripain. La Clostripain actúa sobre la unión peptídica carboxílica de aminoácidos cargados positivamente y a diferencia de la Tripsina, prefiere marcadamente los residuos de Arginina que los de Lisina (Ref. 179). Las digestiones de la CK-BB y la CK-EIP con Clostripain mostraron un perfil idéntico de los picos mayores, si bien la concentración relativa de los mismos fue diferente (Fig. 22A y B respectivamente). Se observó una alta concentración de fragmentos muy polares que no han sido separados con el gradiente utilizado, por eso, no es posible suponer por el número de péptidos obtenidos (comparados con los deducidos de la secuencia aminoacídica de la CK-BB, Ref. 200) que todas las uniones Arg-X han sido digeridas y así concluir que la unión presente en la CK-BB y ausente en la CK-EIP reconocida por la Tripsina sea del tipo Lys-X y no Arg-X.

Otra proteasa utilizada fue la α -Quimotripsina que corta en la unión carboxílica del Triptofano, Tirosina, Fenilalanina, Leucina y Metionina con ocasionales cortes en otros sitios. Si el residuo siguiente es Prolina el corte no ocurre y la presencia de residuos ácidos en cualquiera de los lados del residuo básico reduce la velocidad de corte significativamente. Además la acción de la Quimotripsina es difícil de predecir con exactitud pues depende de factores fuera del entorno de la unión cortada (Ref. 178).

Se observa en los cromatogramas de las digestiones de la CK-BB y la CK-EIP (Fig. 23A y B respectivamente) con

Quimotripsina, la presencia de un pico menor a 63.94' en la digestión de la CK-BB que no está presente en la digestión de la CK-EIP, sin embargo por ser un pico menor y haber diferencias relativas de concentración entre los picos puede que su ausencia en el cromatograma de la CK-EIP no se deba a la ausencia de dicha unión en la correspondiente posición en la CK-EIP sino a una diferencia de velocidad de corte por factores fuera del entorno inmediato de la unión involucrada, lo que es una característica de la Quimotripsina. El perfil de los picos mayores es idéntico en los cromatogramas de ambas proteínas.

F- ¿Son la CK-EIP y la CK-BB la misma proteína?

1) La CK-EIP presenta uno o mas epitopes que están ausentes en la CK-BB.

2) La CK-EIP presenta un pI de 4.55 y la CK-BB un pI de 4.9.

3) La CK-EIP presenta una unión Asp-Pro o Asp-X que no se encuentra en la CK-BB en la correspondiente posición.

4) La CK-EIP es digerida por tratamiento ácido suave con ClH 0.04N mientras que la CK-BB permanece inalterada.

5) La CK-EIP es digerida a péptidos diferentes de los que produce la CK-BB por digestión con BrCN en ClH 0.06N.

6) La CK-EIP carece de una unión del tipo Lys-X o Arg-X en la posición correspondiente en que se encuentra en la CK-BB.

La cadena polipeptídica B difiere, en su secuencia aminoacídica, de la cadena polipeptídica de la CK-EIP.

La CK-EIP y la CK-BB no son la misma proteína.

Reiss y Kaye describieron a la CK-BB como el mayor componente de la PrI en base a su comportamiento cromatográfico, su inmunoprecipitación con antisuero contra la CK-BB (Ref. 137) y por los patrones obtenidos por fluorografía del PAGE-SDS corrido con las digestiones con proteasa de las proteínas correspondientes a la movilidad electroforética de la PrI proveniente de la proteína radioactiva sintetizada por el útero intacto o por el ARN-m obtenido de cerebro o de útero al ser traducidos en un lisado de reticulocitos de conejo y corridos por electroforesis bidimensional previo agregado de proteínas de cerebro no marcadas (Ref. 143). Sin embargo por lo demostrado con el anticuerpo obtenido con la PrI purificada del órgano blanco de la hormona (la CK-EIP) y por los perfiles de las digestiones químicas y enzimáticas descritas, la CK-EIP y la CK-BB no son la misma proteína.

G- ARN-m de la CK-EIP

Con el objetivo de estudiar la relación existente entre la CK-EIP y la CK-BB a nivel nucleotídico se purificó el ARN-m de la CK-EIP.

La estrategia utilizada fue la siguiente: por comparación de los perfiles radioactivos obtenidos en PAGE-SDS de los productos de la traducción in vitro de ARN-m de útero de rata prepúber, de útero de rata prepúber inducida con estrógeno y de útero de rata adulta, se determinó la presencia de un polipeptido de peso molecular ligeramente menor que la CK-EIP. El aumento de la incorporación radioactiva de la traducción se ponía de manifiesto por el aumento de los ARN-m inducidos por estrógeno frente a la incorporación radioactiva basal de la traducción de los ARN-m de útero de rata prepúber sin inducir. Dicho polipeptido también estaba presente en la traducción in vitro de los ARN-m de rata adulta.

Sin embargo cuando los productos de traducción sometidos a PAGE-SDS y transferidos a Nitrocelulosa eran inmunodetectados con Anti CK-EIP o Anti CK-BB y Proteína A marcada con ^{125}I no se visualizaba reacción positiva alguna. Los productos de la

traducción in vitro tampoco podían ser inmunoprecipitados con Anti CK-EIP o Anti CK-BB. Cabían dos posibilidades: 1) la concentración de dicho polipéptido estaba por debajo de los límites de detección o 2) no había relación entre el polipéptido obtenido y la CK-EIP.

Para lograr un enriquecimiento del ARN-m de la CK-EIP se utilizó entonces un gradiente de Sacarosa que resultó en la obtención de suficiente polipéptido en la traducción in vitro que permitió inmunodetectar la CK-EIP con Anti CK-EIP (Fig. 26), Anti CK-BB y el MAb-28. La preparación de ARN-m enriquecida en el ARN-m de CK-EIP hará posible que, en el clonado en λ gt11 de los ADN copia, el porcentaje de clones obtenidos con ADN copia del ARN-m de CK-EIP sea suficiente como para que un número manejable de clones a testear conduzca a la obtención del mismo.

La secuenciación del ADN copia del ARN-m de CK-EIP permitirá la obtención de la secuencia aminoacídica de la proteína inducida por estrógenos en útero de rata prepúber.

CONCLUSION

1) La CK-BB de cerebro de rata prepúber fue purificada por cromatografía en DEAE-Sephacel y en HTP. La CK-BB eluyó a 0.02M de ClNa de la columna DEAE-Shepacel y a 0.018M de fosfato de la columna de HTP.

2) El análisis por PAGE-SDS de la CK-BB purificada mostró por tinción con Coomassie Brilliant Blue una sola banda de proteína con un peso molecular aparente de 49000.

3) Se produjeron anticuerpos policlonales en conejo contra la CK-BB y se purificaron las IgG contra CK-BB y las IgG contra CK-EIP por cromatografía en Proteína A Sepharosa. Anti CK-EIP y Anti CK-BB fueron utilizadas en los estudios inmunológicos comparativos de la CK-EIP y la CK-BB por SIA e Inmunodifusión Bidimensional:

a) La CK-BB fue reconocida en el SIA por Anti CK-BB con igual intensidad que la CK-EIP. La CK-BB fue reconocida en el SIA por Anti CK-EIP con aproximadamente 50% menos de intensidad que la CK-EIP.

b) La CK-EIP y la CK-BB presentaron en el análisis por Inmunodifusión Bidimensional frente a Anti CK-EIP una

reacción de identidad parcial.

Se concluye que la CK-EIP y la CK-BB son distinguibles inmunológicamente. La CK-EIP presentó uno o más epítopes que están ausentes en la CK-BB.

4) Los puntos isoelectríficos de la CK-EIP y la CK-BB fueron comparados por PAGE-IEF. La CK-EIP presentó un pI de 4.55 y la CK-BB un pI de 4.9.

5) La CK-EIP y la CK-BB fueron comparadas mediante estudios de digestiones químicas:

a) El análisis por PAGE-SDS de las digestiones de la CK-EIP y la CK-BB con ácido fórmico 70% mostro que la CK-EIP presenta una union Asp-Pro o Asp-X que no se encuentra presente en la CK-BB en la correspondiente posición.

b) El análisis por PAGE-SDS de las digestiones de la CK-EIP y la CK-BB con ácido fórmico 88% no mostro diferencia entre ambas proteínas.

c) El análisis por PAGE-SDS de las digestiones de la CK-EIP y la CK-BB con ácido clorhídrico 0.04N mostro que la CK-EIP era digerida produciendo por lo menos tres péptidos de peso molecular de 47000, 45000 y 32000, mientras que la CK-BB permaneció inalterada.

d) El análisis por PAGE-SDS de las digestiones de la CK-EIP y la CK-BB con bromuro de cianógeno 1000M en exceso en ácido fórmico 70%, no mostró diferencia entre ambas proteínas.

e) El análisis por PAGE-SDS de las digestiones de la CK-EIP y la CK-BB con bromuro de cianógeno 100M en exceso en ácido clorhídrico mostró que la CK-EIP es digerida a péptidos diferentes de los producidos por la CK-BB, la CK-BB produjo por lo menos tres péptidos más que la CK-BB.

6) La CK-EIP y la CK-BB fueron comparadas por estudios de digestiones enzimáticas:

a) El análisis por HPLC en fase reversa de los productos de las digestiones de la CK-EIP y la CK-BB con Tripsina mostraron que CK-EIP carece de una unión del tipo Lys-X o Arg-X en la posición correspondiente en que se encuentra en la CK-BB.

b) El análisis por HPLC en fase reversa de los productos de las digestiones de la CK-EIP y la CK-BB con Quimotripsina y con Clostripain no mostraron diferencia entre ambas proteínas.

Se concluye de las digestiones químicas y enzimáticas que la cadena polipeptídica B de la CK-BB difiere en su secuencia

aminoacídica de la cadena polipeptídica de la CK-EIP. La CK-EIP y la CK-BB no son la misma proteína.

7) Con el objetivo de dilucidar la relación existente entre la CK-EIP y la CK-BB a nivel nucleotídico se purificó el ARN-m de la CK-EIP:

a) Los ARN-m de útero de ratas prepúberes inducidas por estrógeno, de útero de ratas prepúberes controles y de útero de ratas adultas fueron purificados por el método de isotiocianato de guanidina y por columna de Oligo(dT)-Celulosa.

El análisis de los perfiles radioactivos obtenidos en PAGE-SDS de los productos de la traducción in vitro de los ARN-m de útero de ratas prepúberes inducidas con estrógeno y de útero de ratas adultas mostró la presencia de un polipeptido de peso molecular ligeramente menor que el de la CK-EIP que no fue detectado en el caso del análisis del ARN-m obtenido de útero de ratas prepúberes controles.

b) Un enriquecimiento del ARN-m de la CK-EIP fue logrado mediante un fraccionamiento en gradiente de sacarosa 4-20% del ARN-m de útero de ratas prepúberes inducidas por estrógeno. El análisis de los productos de la traducción in vitro de las fracciones del gradiente de sacarosa de los ARN-m de útero de rata prepúberes inducidas por estrógeno, realizado por electroforesis en PAGE-SDS, electrotransferencia a

nitrocelulosa e inmunodetección con Anti CK-EIP, Anti CK-BB y el MAb-28 mostró la presencia de la CK-EIP proveniente de la fracción de 10x de sacarosa del fraccionamiento del ARN-a.

A handwritten signature consisting of several vertical strokes and a horizontal line at the bottom.A handwritten signature with a large, sweeping initial 'S' and a long horizontal line extending to the right.A handwritten signature with a large, sweeping initial 'S' and a long horizontal line extending to the right.

BIBLIOGRAFIA

- 1-Notides, A.B. and Gorski, J. (1966) *Biochemistry* 56, 230.
- 2-Barnea, A. and Gorski, J. (1970) *Biochemistry* 9, 1899.
- 3-Katzenellenbogen, B.S. and Gorski, J. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 1299.
- 4-DeAngelo, A.B. and Gorski, J. (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 66, 693.
- 5-Mueller, G.C. (1953) *J. Biol. Chem.* 204, 77.
- 6-Mueller, G.C. and Herranen, A.M. (1956) *J. Biol. Chem.* 219, 585.
- 7-Herranen, A.M. and Mueller, G.C. (1956) *J. Biol. Chem.* 233, 369.
- 8-Jervell, K.F., Diniz, C.R. and Mueller, G.C. (1958) *J. Biol. Chem.* 231, 945.
- 9-Mueller, G.C., Herranen, A.M. and Jervell, K.F. (1958) *Recent Progr. Hormone Research* 148, 95.
- 10-Herranen, A.M. and Mueller, G.C. (1957) *Biochim. Biophys. Acta* 24, 233.
- 11-McCorquodale, D.J. and Mueller G.C. (1958) *J. Biol. Chem.* 232, 31.
- 12-Mueller, G.C., Gorski, J. and Aizawa, Y. (1961) *Biochemistry* 47, 164.
- 13-Nomura, M., Hall, B.D. and Spiegelman, S. (1960) *J. Mol. Biol.* 2, 306.
- 14-Brenner, S., Jacob, F. and Meselson, M. (1961) *Nature* 190, 576.
- 15-Reich, E., Franklin, R.M., Shatkin, A.J. and Tatum, E.L. (1961) *Science* 134, 556.
- 16-Goldberg, I.H. and Rabinowitz, M. (1962) *Science* 136, 315.
- 17-Hurwitz, J., Furth, J.J., Malamy, M. and Alexander M. (1962) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48, 1222.

- 18-Tamaoki, T. and Mueller G.C. (1962) Biochem. Biophys. Res. Commun. 9, 451.
- 19-Jacob, F. and Monod, J. (1961) J. Mol. Biol. 3, 318.
- 20-Ui, H. and Mueller, G.C. (1963) Biochemistry 50, 256.
- 21-Gorski, J. and Nicolette, J. (1963) Arch. Biochem. Biophys. 103, 418.
- 22-Weiss, S.B. (1960) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 46, 1020.
- 23-Gorski, J. (1964) J. Biol. Chem. 239, 889.
- 24-Widnell, C.C. and Tata, J.R. (1966) Biochim. Biophys. Acta 123, 478.
- 25-Hamilton, T.H., Widnell, C.C. and Tata, J.R. (1965) Biochim. Biophys. Acta 108, 168.
- 26-Nicolette, J.A. and Mueller, G.C. (1966) Biochem. Biophys. Res. Commun. 24, 851.
- 27-Nicolette, J.A., Lemahieu, M.A. and Mueller, G.A. (1968) Biochem. Biophys. Res. Commun. 166, 403.
- 28-Hamilton, T.H. (1968) Science 161, 649.
- 29-Hamilton, T.H., Widnell, C.C. and Tata, J.R. (1968) J. Biol. Chem. 243, 408.
- 30-Barry, J and Gorski, J. (1971) Biochemistry 10, 2384.
- 31-Raynaud-Jammet, C., Bieri, F. and Baulieu, E.E. (1971) Biochim. Biophys. Acta 247, 355.
- 32-Roeder, R.G. and Rutter, W.J. (1969) Nature (London) 224, 234.
- 33-Roeder, R.G. and Rutter, W.J. (1970) Biochemistry 9, 2543.
- 34-Fiume, L. and Wieland, Th. (1970) FEBS Letters 8, 1.
- 35-Glasser, S.R., Chytil, F. and Spelsberg, T.C. (1972) Biochem. J. 130, 947.
- 36-Notestein, W.D. and Gorski, J. (1963) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 50, 250.
- 37-Gorski, J. and Axman, M.C. (1964) Arch. Biochem. Biophys. 105, 517.

- 38-Horgen, P.A. and Griffin, D.H. (1971) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 338.
- 39-Peatan, I. and Friedman, R.M. (1968) Science 160, 316.
- 40-Kaye, A.M., Ickeson, I. and Lindner H.R. (1971) Biochim. Biophys. Acta 252, 150.
- 41-Means, A.R. and Hamilton, T.H. (1966) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 56, 686.
- 42-Means, A.R. and Hamilton, T.H. (1966) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 56, 1594.
- 43-Baulieu, E.E., Alberga, A., Raynaud-Jamnet, C. and Wira C.R. (1972) Nature New Biol. 236, 236.
- 44-Knowler, J.T. and Smellie R.M.S. (1971) Biochem. J. 125, 605.
- 45-Mayol, R.F. and Thayer, S.A. (1970) Biochemistry 9, 2484.
- 46-Wira, C.R. and Baulieu, E.E. (1971) C. R. Acad. Sci. 273, 218.
- 47-Anderson, J. Clark, J.H. and Peck, E.J., Jr. (1972) Biochem. J. 126, 561.
- 48-Somjen, D., Somjen, G., King, R.J.B., Kaye, A.M. and Lindner, H.R. (1973) Biochem. J. 136, 25.
- 49-Iacobelli, S. (1973) Nature New Biol. 245, 154.
- 50-Katzenellenbogen, B.S. (1975) Endocrinology 96, 289.
- 51-Martin, L. and Finn, C.A. (1968) J. Endocr. 41, 363.
- 52-Smith, J.A., Martin, L., King, R.J.B. and Vertes, M. (1970) Biochem. J. 119, 773.
- 53-Uriel, J., Rubio, N., Aussel, C., Bellanger, F. and Loisillier, M.F. (1972) C. R. Hebd. Seanc. Acad. Sci., Paris 275, 2715.
- 54-Jensen, E.V., DeSombre, E.R., Hurst, D.J., Kawashima, T. and Jungblut, P.W. (1967) Archs. Anat. Microsc. Morph. Exp. 56, 547.
- 55-Stumpf, W.E. (1968) Endocrinology 83, 777.
- 56-Kaye, A.M., Sheratzky, D. and Lindner, H.R. (1972) Biochim. Biophys. Acta 261, 475.

- 57-Clark, B.F. (1971) J. Endocr. 50, 527.
- 58-Tachi, C., Tachi, S. and Lindner, H.R. (1972) J. Reprod. Fert. 31, 59.
- 59-Katzenellenbogen, B.S. and Leake, R.E. (1974) J. Endocr. 63, 439.
- 60-Katzenellenbogen, B.S. and Gorski (1975) in: Biochemical Actions of Hormones, ed. G. Litwack (Academic Press, NY) Vol III, pp.187.
- 61-Krueger, W.A., Bo, W.J. and Chung, M.R. (1978) Biol. Reprod. 19, 385.
- 62-Leroy, F.C., Bogaert, C. and VanHoeck, J. (1976) J. Endocr. 70, 517.
- 63-Peel, S. and Bulmer, D. (1975) J. Reprod. Fertil. 42, 189.
- 64-Gould, S.F., Bernstein, M.H. and Purcho, R.G. (1978) Biol. Reprod. 19, 790.
- 65-West, N.B., Norman, R.L., Sandow, B.A. and Brenner, R.M. (1978) Endocrinology 103, 1732.
- 66-Galand, P., Leroy, F., Chretien, J. (1971) J. Endocr. 49, 243.
- 67-Martin, L., Finn, C.A. and Trinder, G. (1973) J. Endocr. 56, 133.
- 68-Martin, L., Finn, C.A. and Trinder, G. (1973) J. Endocr. 56, 303.
- 69-Heald, P.J., Govan, A.D.T. and O'Grady, J.E. (1975) J. Reprod. Fertil. 42, 593.
- 70-Alberga, A. and Baulieu, E.E. (1968) Mol. Pharmacol. 4, 311.
- 71-Martel, D. and Psychoyos, A. (1978) J. Endocr. 76, 145.
- 72-Williams, L.T. and Lefkowitz, R.J. (1976) Science 192, 791.
- 73-Pollard, J.W. and Martin L. (1975) Mol. Cell Endocrinol. 2, 183.
- 74-Koligan, K.B. and Stormshak, F. (1977) Endocrinology 101, 524.

- 75-Jackson, V. and Chalkley, R. (1974) J. Biol. Chem. 249, 1615.
- 76-Henricks, D.M. and Harris, R.B. (1978) Endocrinology 103, 176.
- 77-Makler, A. and Eisenfeld, A.J. (1974) J. Clin. Endocrinol. Metab. 38, 628.
- 78-Ratajczak, T. and Hahnel, R. (1974) Biochim. Biophys. Acta 338, 104.
- 79-Tseng, L. and Gurbide, E. (1973) Endocrinology 93, 245.
- 80-Tseng, L. (1978) Endocrinology 102, 1398.
- 81-Vladimirsky, F., Chen, L., Amsterdam, A., Zor, U. and Lindner, H.R. (1977) J. Reprod. Fertil. 49, 61.
- 82-Sananes, N., Weiller, S., Baulieu, E.E. and LeGoascagne, C. (1978) Endocrinology 103, 86.
- 83-Pietras, R.J. and Szego, C.M. (1975) Endocrinology 96, 946.
- 84-Pietras, R.J. and Szego, C.M. (1975) Endocrinology 97, 1445.
- 85-Satyaswaroop, R.G., Fleming, H., Bressler, R.S. and Gurbide, E. (1978) Cancer Res. 38, 4367.
- 86-Kirk, D., King, R.J.B., Keyes, J., Peachey, L., Hirsch, P.J. and Taylor, R.W.T. (1978) In Vitro 14, 651.
- 87-Williams, D. and Gorski, (1973) Biochemistry 12, 297.
- 88-Liszczyk, T.M., Richardson, G.S., MacLaughlin, D.T. and Kornblith, P.L. (1977) In Vitro 13, 344.
- 89-Gerschenson, L.E., Berliner, J. and Yang, J. (1974) Cancer Res. 34, 2873.
- 90-Gerschenson, L.E. and Berliner, J.A. (1976) J. Steroid. Biochem. 7, 159.
- 91-Beaumont, J.M. and Knowler J.T. (1983) J. Steroid Biochem. 19, 1503.
- 92-Kassis, J.A., Sakai, D., Walent, J.H. and Gorski, J. (1984) Endocrinology 114, 1558.
- 93-Fleming, H., Namit, C. and Gurbide, E. (1980) J. Steroid Biochem. 12, 169.

- 94-Fleming, H. and Gurside, E. (1981) *Endocrinology* 106, 1744.
- 95-Murai, J.T., Lieberman, R.C., Yang, J.J. and Gerschenson, L.E. (1979) *Endocr. Res. Commun.* 6, 235.
- 96-McCormack, S.A. and Glasser, S.R. (1980) *Endocrinology* 106, 1634.
- 97-Heuberger, B., Fitzka, I., Wasner, G. and Kratochvil, K. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 2957.
- 98-Maresses, N. and Galand, P. (1982) *Mol. and Cell. Endocr.* 28, 671.
- 99-Dupont-Maresses, N. and Galand, P. (1975) *Endocrinology* 96, 1587.
- 100-Kuivanen, P.C. and DeSombre E.R. (1985) *J. Steroid Biochem.* 22, 439.
- 101-Sarff, M. and Gorski, J. (1971) *Biochemistry* 10, 2557.
- 102-Milgrom, E., Atger, M. and Baulieu, E.E. (1970) *Steroids* 16, 741.
- 103-Katz, J., Finlay, T.H., Tom, C. and Levitz, M. (1980) *Endocrinology* 107, 1725.
- 104-Finlay, T.H., Katz, J. and Levitz, M. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 10914.
- 105-Finlay, T.H., Katz, J., Kadner, S. and Levitz, M. (1983) *J. Steroid Biochem.* 19, 743.
- 106-Barker, K.L. (1980) in: *The Endometrium*, ed. F.A. Kimball (Spectrum Publications, Jamaica, NY) pp.227.
- 107-Anderson, W.A., Kang, Y.H. and De Sombre, E.R. (1975) *J. Cell. Biol.* 64, 668.
- 108-Lyttle, C.R. and DeSombre, E.R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 3162.
- 109-Peltz, S.W., Katzenellenbogen, B.S., Kneifel, M.A. and Mangel, W.F. (1983) *Endocrinology* 112, 890.
- 110-Kneifel, M.A., Leytus, S.P., Fletcher, E., Weber, T., Mangel, W.F. and Katzenellenbogen, B.S. (1982) *Endocrinology* 111, 493.
- 111-King, W.J., Allen, T.C. and DeSombre, E.R. (1981) *Biol. Reprod.* 25, 859.

- 112-DeSombre, E.R. (1984) in: Biochemical Actions of Hormones, ed. G. Litwack (Academic Press, NY) Vol. XI, pp.309.
- 113-Tchernitchin, A., Roorijck, J., Tchernichin, X., Vandenhende, J. and Galand, P. (1974) Nature (London) 248, 142.
- 114-Tchernitchin, A. (1979) J. Steroid Biochem. 11, 417.
- 115-Tchernitchin, A.N. (1983) J. Steroid Biochem. 19, 95.
- 116-Mayol, R.F. and Thayer, S.A. (1970) Biochemistry 9, 2484.
- 117-Cohen, M.E. and Hamilton, T.H. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 4346.
- 118-Cohen, M.E. and Hamilton, T.H. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. 64, 633.
- 119-Maresse, N. and Galand, P. (1980) J. Steroid Biochem. 12, 299.
- 120-Teng, C.S. and Hamilton, T.H. (1970) Biochem. Biophys. Res. Commun. 40, 1231.
- 121-Korach, K.S., Harris, S.E. and Carter, D.B. (1981) Molec. Cell. Endocr. 21, 243.
- 122-Skipper, J.K., Eakle, S.D. and Hamilton, T.H. (1980) Cell 22, 69.
- 123-Katzenellenbogen, B.S. and Williams, L.B. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 1281.
- 124-Voaker, A., Iacobelli, S. and Kram, R. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 4482.
- 125-Kaye, A.M., Walker, M.D. and Somjen, D. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 7.
- 126-King, R.J.B., Somjen, D., Kaye, A.M. and Lindner, H.R. (1974) Molec. Cell. Endocr. 1, 21.
- 127-Iacobelli, S., King, R.J.B. and Vokaer, A. (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun. 76, 1230.
- 128-Mayol, R.F. (1975) Molec. Cell. Endocr. 2, 133.
- 129-Walker, M.D., Gozes, I., Kaye, A.M., Reiss, N. and Littauer, U.Z. (1976) J. Steroid Biochem. 7, 1083.
- 130-Walker, M.D., Negreanu, V., Gozes, I. and Kaye, A.M. (1979) FEBS Letters 98, 187.

- 131-Kaye, A.M., Reiss, N. and Walker, M.D. (1979) in: Development of Responsiveness to Steroid Hormones, ed. Kaye, A.M. and Kaye, M. (Pergamon Press, Oxford) pp.1.
- 132-Kaye, A.M. and Reiss, N. (1980) in: Steroid Induced Proteins, ed. Beato, M. (Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam) pp.3.
- 133-Marangos, P.J., Zomzely-Neurath, C., Luck, D.C.M. and York, C. (1975) J. Biol. Chem. 250, 1884.
- 134-Marangos, P.J., Zomzely-Neurath, C. and York, C. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun. 68, 1309.
- 135-Wood, T. (1963) Biochem. J. 87, 453.
- 136-Wood, T. (1964) Biochem. J. 91, 453.
- 137-Reiss, N.A. and Kaye, A.M. (1981) J. Biol. Chem. 256, 5741.
- 138-Manak, R.C., Wertz, N., Slabaugh, M., Denari, H., Jen-Te Wang and Gorski, J. (1980) in: Steroid Induced Uterine Proteins, ed. Beato, M. (Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam) pp.21.
- 139-Kumar, S.A., O'Connor, D.L., Seeger, J.T. and Beach, T.A. (1983) Biochem. Biophys. Res. Commun. 111, 156.
- 140-Kumar, S.A., and Macario, A.J.L. (1985) Hybridoma 4, 297.
- 141-Kumar, S.A., Macario, A.J.L., Dickerman, H.W. and Pastini, A.C. (1985) 13th Intl. Congress of Biochemistry Abs. TH-218 pp.499.
- 142-Pastini, A.C. and Devi, M. (1986) in: Advances in Gene Technology: Molecular Biology of the Endocrine System, ICSU Short Reports, (Cambridge University Press) Vol. 4, pp.316.
- 143-Kaye, A.M. and Walker, M.D. (1981) J. Biol. Chem. 256, 23.
- 144-Kaye, A.M. (1983) J. Steroid Biochem. 19, 33.
- 145-Lehmann, H. (1935) Biochem. Z. 281, 271.
- 146-Burger, A., Richterich, P. and Aebi, H. (1964) Biochem. Z. 339, 305.
- 147-Jacobs, H., Heldt, H.W. and Klingenberg, M. (1964) Biochem. Biophys. Res. Commun. 16, 516.

- 148-Dance, N. and Watts, D.C. (1962) Biochem. J. 84, 114P.
- 149-Dawson, D.M., Eppenberger, H.M. and Kaplan, N.O. (1965) Biochem. Biophys. Res. Commun. 21, 346.
- 150-Eppenberger, H.M., Dawson, D.M. and Kaplan, N.O. (1967) J. Biol. Chem. 242, 204.
- 151-Dawson, D.M., Eppenberger, H.M. and Kaplan, N.O. (1967) J. Biol. Chem. 242, 210.
- 152-Berlet, H.H., Bonsmann, I. and Birringer, H. (1976) Biochim, Biophys, Acta 437, 166.
- 153-Shattor, J.B., Morris, H.P. and Weinhouse, S. (1979) Cancer Res. 39, 492.
- 154-Roberts, R. and Grace, A.M. (1980) J. Biol. Chem. 255, 2870.
- 155-Perryman, M.B., Strauss, A.W., Buettner, T.L. and Roberts, R. (1983) Biochim. Biophys. Acta 747, 284.
- 156-Lott, J.A. and Stang, J.M. (1980) Clin. Chem. 26, 1241.
- 157-Willerson, J.T., Stone, M.J. and Ting, R. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 1711.
- 158-Fang, V.S., Cho, H.W. and Meltzer, H.Y. (1977) Clin. Chem. 23, 1898.
- 159-Neumeier, D., Hofstetter, R. and Gluck, B. (1977) Clin. Chim. Acta 79, 107.
- 160-Rosenberg, U., Kunz, G., Frischauf, A., Lehrach, H., Mahr, R., Eppenberger, H.M. and Perriard, J.C. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 6589.
- 161-Wallimann, T., Pelloni, G., Turner, D.C. And Eppenberger, H.M. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 4296.
- 162-Eppenberger, H.M., Perriard, J.C. and Rosenberg, U. (1981) J. Cell Biol. 89, 185.
- 163-Eckert, B.S., Koons, S.J., Schantz, A.W. and Zobel, C.R. (1980) J. Cell Biol. 86, 1.
- 164-Koons, S.J., Eckert, B.S. and Zobel, C.R. (1982) Expl. Cell Res. 140, 401.
- 165-Fuseler, J.W., Eckert, B.S., Koons, S.J. and Shay, J.W. (1982) in: Cell and Muscle Motility, ed. Dowben, R.M. and

- Shay, J.W., Vol. 1, pp.103.
- 166-Silver, R.B., Saft, M.S., Taylor, A.D. and Cole, R.D. (1982) J. Cell Biol. 95, 306.
- 167-Cande, W.Z. (1983) Nature 304, 557.
- 168-Kaye, A.M., Reiss, N., Shaer, A., Sluyser, M., Iacobelli, S., Amroch, D. and Soffer, Y. (1981) J. Steroid Biochem. 15, 69.
- 169-Bessman, S.P. and Carpenter, C.L. (1985) Ann. Rev. Biochem. 54, 831.
- 170-Peterson, E.A. (1970) in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Cellulosic Ion Exchangers, ed. Work, T.S. and Work, E. (North Holland Publishing Company, Amsterdam) Vol. 2, Part II.
- 171-Tiselius, A., Hjerten, S. and Levin, O. (1956) Arch. Biochem. Biophys. 65, 132.
- 172-Bernardi, G. (1973) in: Methods in Enzymology, Vol. 27, pp.471.
- 173-Ey, P.L., Prowse, S.J. and Jenkin, C.R. (1978) Immunochemistry 15, 429.
- 174-Ouchterlony, O (1967) in: Handbook of Experimental Immunology, ed. Weir, D.M. (Blackwell, Oxford) pp.655.
- 175-Landon, M. (1977) in: Methods in Enzymology, Vol. 47, pp.145.
- 176-Gross, E. (1967) in: Methods in Enzymology, Vol. 11, pp.238.
- 177-Allen, G. (1981) in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Sequencing of Proteins and Peptides, ed. Work, T.S. and Burdon, R.S. (Elsevier/North Holland, Amsterdam) Vol. 9, pp.53.
- 178-_____ pp.59.
- 179-Mitchell, W.M. (1977) in: Methods in Enzymology, Vol. 47, pp.165.
- 180-Isoelectric Focusing, Principles and Methods. Pharmacia Fine Chemicals. (EF Printed in Sweden by Ljungforetagen AB, Orebro, 1982-1), pp.45.
- 181-Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1982) in: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, ed. Cold Spring Harbor Laboratory (Cold Spring Harbor, NY), pp.196.

182-Clemens, M.J. (1984) in: Transcription and Translation, A Practical Approach, ed. Hames, B.D. and Higgins, S.J. (IRL Press, Oxford, England) pp.226.

183_____ pp.225.

184-Laemmli, U.K. (1970) Nature (London) 227, 680.

185-Goding, J.W. (1983) in: Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (Academic Press, Harcourt Brace Jovanovich, Publishers, London), pp.175.

186-Hernodson, M. and Mahoney, W.C. (1983) in: Methods in Enzymology, Vol. 91, pp.352.

187-Conway de Macario, E., Macario, A.J.L. and Jovell, R.J. (1983) J. Immunol. 59, 39.

188-Bradford, M.M. (1976) Anal. Biochem. 72, 248.

189-Grace, A. and Roberts, R. (1982) Clin. Chim. Acta 123, 59.

190-Inglis, A.S. (1983) in: Methods in Enzymology, Vol. 91, pp.324.

191-Benfield, P.A., Henderson, L. and Pearson, M.L. (1985) Gene 39, 263.