

Tesis de Posgrado

La ribonucleasa P DE *Bacillus subtilis* : una enzima con un ARN catalítico

Reich, Claudia Irene

1988

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

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

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

Cita tipo APA:

Reich, Claudia Irene. (1988). La ribonucleasa P DE *Bacillus subtilis* : una enzima con un ARN catalítico. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2169_Reich.pdf

Cita tipo Chicago:

Reich, Claudia Irene. "La ribonucleasa P DE *Bacillus subtilis* : una enzima con un ARN catalítico". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1988.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2169_Reich.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Tesis
2.169
Ej. 2

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

TEMA DE TESIS

LA RIBONUCLEASA P DE *Bacillus subtilis*

Una Enzima con un ARN Catalítico

por

Claudia Irene Reich

DIRECTOR DE TESIS

DR. NORMAN R. PACE

1988

LUGAR DE TRABAJO
UNIVERSIDAD DE INDIANA

TESIS

LA RIBONUCLEASA P DE *Bacillus subtilis*

Una Enzima con un ARN Catalítico

por

Claudia Irene Reich

Licenciada en Ciencias Biológicas, Universidad de Buenos Aires, 1972

1988

- 2.169 -
ej. 2

Esta tesis ha sido aprobada en forma y contenido

Norman R. Pace
Dr. Norman R. Pace
Profesor
Indiana University

Fecha Nov. 2, 1988

¿Es que nosotros, al mantener que los dioses existen, nos engañamos con mentiras y sueños insustanciales, mientras que son sólo el azar y el cambio los que controlan el mundo?

Eurípides

La ciencia nunca acierta. Cada vez que resuelve un problema, sólo consigue plantear diez más.

George Bernard Shaw

El universo es no sólo más extraño que lo imaginamos, sino más extraño que lo podemos imaginar.

J. B. S. Haldane

Claudia Irene Reich

La Ribonucleasa P de *Bacillus subtilis*: Una enzima con un ARN catalítico

Tesis dirigida por el Profesor Dr. Norman R. Pace

La ribonucleasa P es la enzima responsable de madurar el término 5' de los precursores de los ácidos ribonucleicos de transferencia (ARN_t). En eubacterias, consta de dos componentes, uno proteico y uno ribonucleico (Stark *et al.*, 1978). El gen que define el componente ribonucleico de la ARNasa P de *Bacillus subtilis* fue clonado y su secuencia determinada. *In vivo* y en condiciones fisiológicas *in vitro*, ambos componentes son necesarios para efectuar catálisis. Sin embargo, a altas concentraciones de iones mono- y divalentes, el ARN por sí solo es capaz de procesar los pre-ARN_t (Guerrier-Takada *et al.*, 1983); el gen clonado en un vehículo de expresión que contiene el promotor de bacteriófago T₇ permite la síntesis *in vitro* de un ARN que retiene propiedades catalíticas. Las altas concentraciones de cationes necesarias para manifestar la actividad del ARN P cumplen la función de contrarrestar la repulsión electrostática entre el ARN enzima y el ARN sustrato, y así permitir el íntimo contacto requerido para la catálisis. Esto se ha demostrado en el análisis cinético de la reacción catalizada por el ARN P solo; a medida que aumenta la concentración de cationes, el K_m de la reacción disminuye, consistente con la mayor afinidad de la enzima por su sustrato a elevada fuerza iónica; pero la reacción es muy lenta. La posibilidad que la baja velocidad de la reacción se deba a la disociación lenta del producto de la superficie de la enzima se infiere de dos hechos: primero, la enzima no parece discriminar entre precursor y producto maduro ($K_i \cong K_m$); y segundo, el

análisis de la reacción temprana evidencia un primer ciclo rápido de clivaje. La preincubación de la enzima con ARN_t maduro inhibe este primer ciclo; probablemente el ARN_t no se disocia rápidamente impidiendo el acceso de sustrato. Por lo tanto, *in vitro* el paso limitante en la reacción por el ARN P es la disociación del producto de la superficie de la enzima. La reacción catalizada por la holoenzima no presenta este comportamiento; el producto se disocia rápidamente de la enzima una vez efectuada la catálisis.

La influencia de la secuencia 3' terminal CCA sobre el procesamiento del término 5' fue también investigada. Con este fin, se construyeron sustratos que la contienen o no, a partir de precursores que *in vivo* la contienen codificada en el gen o no. El análisis cinético de la reacción sobre estos sustratos evidencia que la secuencia CCA provee un sitio de contacto entre el sustrato y la enzima, posiblemente participando en una unión hidrógeno.

El análisis filogenético hizo posible derivar un modelo de estructura secundaria para el ARN P. Este modelo se basó en la comparación de las secuencias para el ARN P en eubacterias Gram positivas y Gram negativas (purpúreas). El modelo es satisfactorio en el sentido que permite identificar un núcleo de elementos conservados, a pesar de la gran divergencia en estructura primaria. Es en este núcleo común que los elementos necesarios para el reconocimiento del sustrato y para la catálisis probablemente residan. Esta hipótesis fue evaluada experimentalmente construyendo *in vitro* un "minigen" que, clonado en un vehículo de expresión adecuado, permite la síntesis de un ARN que consta sólo de estos elementos conservados y cuyo tamaño es 2/3 del tamaño del ARN P *in vivo*. Se demostró que esta versión reducida del ARN P retiene actividad catalítica.

AGRADECIMIENTOS

A Norman Pace, mi consejero y amigo; a él debo la apreciación y cariño a los ARN, moléculas que recién ahora están dejando ver sus enormes misterios y potencialidades. A los compañeros del laboratorio (Bernadette Pace, Bryan James, Jinsong Liu y David Waugh) por compartir datos conmigo y por las estimulantes discusiones. A Jorge Zorzópulos, que me ayudó durante todo este proceso y con quien he compartido muchas cosas importantes, tales como dos hijos hermosos. A mi hermana Silvia, mi crítica más acerba y más cariñosa. A Gary Olsen, padre de mi tercera hija, Sandra; él fue quien me ayudó a decifrar los misterios arcanos del "monstruo", nuestra computadora Macintosh II; gracias por su ayuda y paciencia en estos tiempos difíciles. Y finalmente al "monstruo", que si bien deglutió muchos párrafos con voracidad, finalmente fue clemente y me permitió cosechar esta tesis.

A mis padres, a mis hijos.

Por ellos, para ellos.

INDICE

INTRODUCCION _____	1
ANTECEDENTES _____	4
Procesamiento de ARNr _____	6
Maduración de los términos _____	6
Remoción de secuencias internas _____	8
El intrón del ARNr 26S de <i>Tetrahymena</i> _____	8
Procesamiento de ARNm _____	10
Procesamiento de ARNt _____	14
Maduración del término 3' _____	16
Maduración del término 5' _____	17
La enzima ARNasa P _____	18
El componente ribonucleico de la ARNasa P _____	20
Reconocimiento del sustrato _____	23
Influencia de la secuencia 3' CCA _____	24
Estructura secundaria del ARN P _____	26
MATERIALES Y METODOS _____	29
Abreviaturas _____	29
Materiales _____	30
Soluciones y medios de cultivo _____	30

Electroforesis en geles de agarosa	31
Electroforesis en geles de poliacrilamida	31
Purificación del ARN P	32
Síntesis y purificación de desoxioligonucleótidos	32
Síntesis de una sonda radiactiva con transcriptasa inversa	33
Purificación de plásmidos	34
Preparación de células HB101 competentes para la transformación	35
Transformación de <i>E. coli</i> HB101 con ADN de plásmidos	36
Preparación de células JM103 competentes para la transfección	36
Transfección de <i>E. coli</i> JM103 con la forma replicativa del fago M13	37
Clonado de secuencias genómicas en pUC19	37
Subclonado en plásmidos y bacteriófago M13	38
Formación de extremos romos en fragmentos de ADN con proyecciones 5'	38
Minipreparación de ADN de plásmidos	39
Minipreparación de lisados de M13	40
Detección de colonias recombinantes en filtros de nitrocelulosa	40
Preparación de templado de cadena simple de M13 para secuenciar	41
Geles de gradiente para determinar secuencia	41
Secuenciación de ADN	42
Síntesis <i>in vitro</i> de ARN P	43

Síntesis <i>in vitro</i> de precursores de ARNt _____	44
Mutagénesis dirigida por oligonucleótidos _____	46
Ensayo enzimático de la ARNasa P (holoenzima) _____	48
Ensayo enzimático del ARN catalítico _____	48
RESULTADOS _____	50
Clonado y secuencia del gen para el ARN de la ARNasa P _____	50
Estrategia para clonar el gen del ARN P _____	51
Clonado del fragmento 5' del gen _____	51
Remoción de secuencias genómicas adyacentes al término 5' del gen del ARN P _____	55
Remoción de secuencias genómicas adyacentes al término 3' del gen del ARN P _____	58
Clonado del gen para el ARN P en un vehículo de expresión _____	59
Estudios enzimáticos de la ARNasa P (holoenzima) y del ARN P catalítico _____	65
Optimización de la reacción catalizada por el ARN P _____	67
Optimización de la reacción catalizada por la holoenzima _____	70
Los parámetros cinéticos K_m y v_{max} de las reacciones catalizadas por la holoenzima y por el ARN P _____	74
Inhibición por producto _____	79
Curso temprano de la reacción _____	79
Influencia de la secuencia 3' CCA sobre el procesamiento del término 5' _____	86
Modificación del término 3' del pre-ARN _r ^{Asp} _____	87

Clonado del pre-ARN _t ^{Leu} y modificación del término 3'	88
Determinación de las condiciones iónicas óptimas para los distintos pre-ARN _t	90
Determinación de los parámetros cinéticos K_m y v_{max} para los diferentes sustratos	95
Estructura secundaria del ARN P	99
DISCUSION	104
Clonado y secuencia del gen para el componente ribonucleico de la ARNasa P	104
La reacción catalizada por la holoenzima y por el ARN P	107
Influencia de la secuencia 3' CCA sobre la actividad de la ARNasa P	114
Estructura secundaria del ARN P	116
ARN como catalizador biológico	123
REFERENCIAS	126

FIGURAS

1. Detección de clones recombinantes. _____	53
2. Secuenciación de ADN. _____	54
3. Mapa parcial de restricción del gen para el ARN P de <i>B. subtilis</i> . _____	56
4. Secuencia del gen para el ARN P de <i>B. subtilis</i> . _____	57
5. Análisis de restricción de clones recombinantes. _____	60
6. Diferencias entre el ARN P <i>in vivo</i> y el sintetizado <i>in vitro</i> . _____	61
7. Análisis electroforético de los ARN sintetizados <i>in vitro</i> . _____	62
8. Actividad enzimática de los ARN sintetizados <i>in vitro</i> . _____	64
9. Ensayo enzimático de la ARNasa P. _____	66
10. Extensión de la reacción en función de la concentración de ARN P. _____	68
11. Curso de la reacción por ARN P. _____	69
12. Determinación de las condiciones iónicas óptimas para la reacción catalizada por ARN P. _____	71
13. Actividad de la holoenzima a distintas concentraciones de MgCl ₂ . _____	73
14. Titulación del ARN P con proteína P purificada. _____	75
15. Análisis cinético de la reacción. _____	76
16. Inhibición por producto de la reacción catalizada por el ARN P. _____	80

17. Inhibición por producto de la reacción catalizada por la holoenzima. _____	81
18. Curso temprano de la reacción en la presencia o no de inhibidor competitivo (ARN _t maduro). _____	83
19. Curso temprano de la reacción por ARN P a diferentes concentraciones de ARN enzima. _____	85
20. Secuencia de los clones en pT71 que contienen el gen para el ARN _t ^{Asp} . _____	89
21. Secuencia de los clones en pTZ18U que contienen el gen para el ARN _t ^{Leu} . _____	91
22. Extensión de la reacción por ARN P sobre los distintos precursores Asp en función de la concentración de NH ₄ Cl. ____	93
23. Extensión de la reacción por ARN P de <i>E. coli</i> sobre los distintos precursores Leu en función de la concentración de NH ₄ Cl. _____	94
24. Análisis cinético de la reacción por la holoenzima sobre los distintos precursores Asp. _____	96
25. Análisis cinético de la reacción por ARN P sobre los distintos precursores Asp. _____	98
26. Comparación de ARN homólogos de <i>B. subtilis</i> y <i>E. coli</i> . _____	100
27. Modelo de estructura secundaria para el ARN P de <i>B. subtilis</i> . _____	102
28. Modelo esquemático de la influencia de cationes y proteína P sobre la reacción catalizada por el ARN P. _____	113
29. Estructura secundaria del ARN P de distintos organismos. _____	118
30. Estructura del ARN miniP. _____	122

INTRODUCCION

El procesamiento de moléculas de ácido ribonucleico (ARN) es una de las actividades fundamentales en todas las células vivas. Con muy pocas excepciones, el producto primario de la transcripción no es la molécula funcional. Estas modificaciones, que pueden ser muy simples o muy complejas, constituyen una de las funciones celulares de importancia mayor, comparable a replicación, transcripción y traducción. Elucidar la forma en que la información genética está organizada, así como el control de su expresión, requerirá también elucidar los mecanismos del procesamiento de los ARN. El procesamiento de los ARN de transferencia (ARN_t) provee un modelo simple y bien definido para el estudio de estos fenómenos.

De todas las enzimas involucradas en el procesamiento de ARN_t en eubacterias, la ribonucleasa P (ARNasa P) es peculiar. Esta enzima, responsable de generar el término 5' maduro de todos los ARN_t, es una ribonucleoproteína (Stark *et al.*, 1978); en 1983, Guerrier-Takada y colaboradores demostraron que el elemento catalítico es el ARN, y no la proteína (Guerrier-Takada *et al.*, 1983). El único precedente para la existencia de un ARN catalítico hasta el momento era el descubrimiento del intrón autoescindible en precursores del ARN ribosomal (ARN_r) 26S en *Tetrahymena* (Kruger *et al.*, 1982). Sin embargo, existe una diferencia fundamental entre el ARN autocatalítico de *Tetrahymena*, y otros descubiertos desde entonces (Cech & Bass, 1986), y el componente

ribonucleico de la ARNasa P: la ARNasa P interviene en una reacción intermolecular, mientras que los ARN autocatalíticos descritos hasta ahora intervienen en el reordenamiento intramolecular que resulta en la escisión del intrón y la formación de la unión exón-exón. La ARNasa P provee un modelo para el estudio del mecanismo de catálisis por ARN, así como la relación ARN-ARN (ejemplificada en la relación enzima-sustrato) y ARN-proteína (ejemplificada en la relación entre ambos componentes de la holoenzima).

Esta tesis presenta datos sobre aspectos funcionales y estructurales de la ARNasa P de *Bacillus subtilis*, una Eubacteria Gram positiva (Woese, 1987) distante filogenéticamente de *Escherichia coli*, el otro organismo en el cual esta enzima ha sido bien caracterizada. Consta de cuatro partes, cuyos resultados serán discutidos separadamente; estas partes son: (1) clonado y secuencia del componente ribonucleico; (2) estudios enzimáticos de la holoenzima y del ARN catalítico; (3) influencia sobre la actividad del ARN catalítico de la secuencia CCA_{OH} en el término 3' maduro de la molécula precursora; y (4) inferencia de la estructura secundaria del ARN P.

Aunque la enzima funciona como una ribonucleoproteína *in vivo*, a altas concentraciones de cationes mono- y divalentes, el ARN por sí solo es capaz de efectuar catálisis (Guerrier-Takada *et al.*, 1983). En esta tesis se demuestra que las altas concentraciones de cationes son necesarias para contrarrestar la repulsión electrostática entre los ARN intervinientes en la reacción y así permitir la formación del complejo enzima-sustrato, necesario para la catálisis. Pero al mismo tiempo, y por las mismas consideraciones electrostáticas, la disociación del producto clivado de la superficie de la enzima está impedida, lo cual provoca una disminución en la velocidad de la reacción. El estudio cinético de la reacción catalizada por la holoenzima

permite inferir el papel que juega el componente proteico; éste proveería un *pool* local de cationes que permitirían la formación del complejo enzima-sustrato, pero que no impedirían la liberación del producto clivado una vez que la catálisis ha sido efectuada. Esta es la primera instancia en la cual es posible asignar funciones a ambos componentes de una ribonucleoproteína.

La presencia de la secuencia 3' CCA_{OH} parece influenciar la eficiencia con que el término 5' de los ARN_t es procesado (Guerrier-Takada *et al.*, 1984). Esta contención es investigada en la presente tesis. Usando técnicas de ingeniería genética, se han construido sustratos que difieren en la presencia o no de esta secuencia, y su habilidad para ser procesados por el ARN P ha sido evaluada. Datos cinéticos permiten inferir que esta secuencia provee un sitio de contacto para el ARN enzima, probablemente contribuyendo una unión hidrógeno.

La secuencia del ARN P de *B. subtilis* también se presenta aquí. De la comparación entre esta secuencia y la de otras eubacterias, se ha deducido un modelo para la estructura secundaria de este ARN. Este modelo ha sido evaluado funcionalmente sintetizando *in vitro* un "minigen" que contiene sólo aquellas regiones del ARN conservadas en todos los organismos analizados. Este "minigen" ha sido clonado en un vehículo de expresión que permite la síntesis *in vitro* del ARN mini P. Se demuestra que esta versión reducida del ARN P retiene propiedades catalíticas.

ANTECEDENTES

La primera evidencia de procesamiento de ARN fue obtenida en 1963 (Scherrer *et al.*, 1963). Marcando células HeLa con uridina tritiada, al aislar las diferentes especies de ARN en gradientes de sacarosa, observaron que la incorporación de radiactividad ocurría primero en una especie de alto peso molecular (45S); después de un cierto tiempo, y en la ausencia de síntesis de ARN (bloqueada con actinomicina D), la radiactividad era detectada en la región correspondiente a 35S, y sólo finalmente se localizaba en las regiones coincidentes con los ARN ribosomales (ARN_r). Esta fue la primera evidencia que los ARN son sintetizados como precursores que requieren una alteración (o procesamiento) antes de convertirse en las moléculas funcionales.

La primera evidencia de la modificación química posttranscripcional proviene de estudios de los ARN de transferencia en *E. coli* (Fleissner & Borek, 1962); en condiciones de metionina limitante, el ARN 4S sintetizado es menos metilado; en experimentos que utilizan doble marca radiactiva se demostró la preferencia en la incorporación de metionina marcada con ¹⁴C en las especies de ARN ya existentes en contraposición a las recién sintetizadas.

El hecho que los ARN de transferencia (ARN_t) se sintetizan en forma de precursores de mayor peso molecular fue evidenciado en células de ratón (Burdon *et al.*, 1967) y en células HeLa (Bernhardt & Darnell, 1969). Este descubrimiento tuvo que esperar el desarrollo de técnicas de separación más refinadas, ya que en células de mamíferos, los precursores de los ARN_t y las

moléculas maduras son muy poco diferentes en tamaño, y no es posible separarlos en gradientes de sacarosa. Usando la entonces nueva técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida, se demostró que la incorporación de uridina tritiada ocurre primero en una especie de un poco más de 4S, y luego aparece en la región correspondiente a los ARN_t maduros (4S). En esta misma serie de experimentos se demostró que los precursores son metilados antes de alcanzar su tamaño maduro, pero el bloqueo de la metilación no impide su procesamiento a la región correspondiente a 4S, y por ende la maduración a su tamaño funcional.

Fue sólo a partir de 1970 que la existencia de procesamiento de ARN en procariotes fue puesta en evidencia. Esto se debió al hecho ahora bien establecido que este fenómeno ocurre inmediatamente después de la transcripción, y por lo tanto los precursores son de muy corta vida media y difíciles de aislar. La evidencia proviene de la caracterización de cepas mutantes de *E. coli*, en las cuales se observó la producción de especies nuevas de ARN que eran reducidas al tamaño correspondiente a ARN_t luego de la incubación con extractos celulares de cepas salvajes (Schedl & Primakoff, 1973).

En la actualidad es evidente que todos los ARN_t, los ARN_r, muchos ARN mensajeros (ARN_m) en procariotes y todos los de eucariotes, requieren procesamiento posttranscripcional para generar las moléculas funcionales. Estas modificaciones incluyen una variedad de reacciones, algunas de ellas muy complejas, desde la remoción de secuencias para generar moléculas maduras del tamaño correcto hasta las modificaciones o adiciones de grupos químicos para producir las especies funcionales. Si bien en algunos casos es fácil atribuir un significado biológico a estos eventos [tales como la separación

de especies de ARN que son cotranscriptas como en el caso de los ARN_r (Perry, 1976), o la producción de mensajeros alternativos (Leff *et al.*, 1986) en algunos sistemas eucariotes], en otras instancias el significado biológico es más difícil de evaluar, como es el caso de muchos intrones que parecen existir con el solo propósito de ser escindidos. En aún otros casos, tales como los nucleótidos raros en los ARN_t o la formación de la estructura metilada llamada "cap" en el término 5' de los mensajeros de eucariotes, el procesamiento tiene claras implicancias funcionales.

A continuación se presenta una breve descripción del procesamiento de los ARN_r y ARN_m ; luego se considera en más detalle el procesamiento de los ARN_t .

Procesamiento de ARN_r

Maduración de los términos

Tanto en procariotes como eucariotes, los ARN_r (16S, 23S y 5S; y 18S, 5,8S y 28S, respectivamente) son sintetizados como una única unidad (Perry, 1976). Las secuencias que separan las regiones correspondientes a las moléculas funcionales, así como las secuencias a ambos términos del precursor deben ser eliminadas, y ciertas bases y residuos de ribosa deben ser metilados. La cotranscripción de los ARN_r asegura la síntesis de cantidades equimoleculares de los componentes del ribosoma, y en ese sentido presenta una clara ventaja evolutiva. Sin embargo, esta interpretación puede ser simplista; en eucariotes el ARN_r 5S, el otro componente ribonucleico del ribosoma, no forma parte de esta unidad y a menudo el gen está localizado en

otro cromosoma (Wimber & Steffensen, 1970). Además, en procariotes, entre los genes que codifican el 16S y el 23S (Lund & Dahlberg, 1977) y más allá del término 5' del gen para el 5S (Morgan *et al.*, 1978) existen genes para ARN_t; y distintos ARN_t se encuentran en distintas unidades transcripcionales; las ventajas de una disposición semejante es objeto de especulación.

El primer clivaje del precursor en *E. coli* es ejecutado por la enzima ribonucleasa III (ARNasa III), y separa las diferentes especies de ARN (Nikolaev *et al.*, 1973), pero no genera los términos maduros, que son generados debido a la acción de una batería de enzimas diferentes, algunas de ellas desconocidas. La ARNasa III también participa en la maduración de algunos precursores multiméricos de ARN_t (McClain, 1979) y algunos ARN_m (Dunn & Studier, 1973). No existe homología evidente a nivel de secuencia entre los sitios de acción de esta enzima en sus diferentes sustratos; la única característica común parece ser que son sitios en los que el ARN forma un duplex (Pace, 1983). A pesar de la variedad de funciones en las cuales esta enzima participa, cepas mutantes carentes de ella son viables (Kindler *et al.*, 1973). Este hecho ilustra la versatilidad y adaptabilidad de las enzimas que intervienen en el procesamiento de ARN, ya que pueden compensar la carencia de alguna de ellas adecuadamente.

En general, la maduración del término 5' de los precursores es llevada a cabo por enzimas endonucleolíticas, que generan grupos 5'-fosfato y 3'-OH en el sitio de catálisis. Es poco lo que se conoce de ellas, aunque está bien establecido el hecho que no actúan sobre ARN desnudo, sino sobre ribonucleoproteínas (Perry, 1976). De la maduración del término 3' es aún menos lo que se sabe; posiblemente algunas de las enzimas involucradas sean exonucleasas.

Remoción de secuencias internas

Todos los ARN_r de eucariotes contienen intrones que deben ser procesados; los esquemas generales de escisión de intrones se detallan más adelante.

En eubacterias, los pre-ARN_r en general no contienen intrones. Una excepción es el precursor del ARN_r 23S de algunas especies de *Salmonella*, que presenta una secuencia extra que es escindida durante su maduración. A diferencia de los intrones típicos, los "exones" en este caso no son ligados covalentemente (D.J. Lane, comunicación personal); la molécula madura consiste de dos polinucleótidos y presumiblemente mantiene su integridad debido a su estructura secundaria. La escisión ocurre en la ausencia de síntesis proteica (bloqueada con cloramfenicol); por lo tanto, el ARN desnudo puede ser sustrato para esta reacción, a diferencia de las ARN maduras que requieren ribonucleoproteínas como sustratos (Pace, 1983). Se ha comprobado recientemente, *in vivo* e *in vitro*, que esta maduración es efectuada por la ARNasa III (A. Burgin, comunicación personal).

El intrón del ARN_r 26S de Tetrahymena

En muchas especies del ciliado *Tetrahymena*, todas las copias del gen nuclear para el ARN_r 26S están interrumpidas por un intrón de aproximadamente 400 nucleótidos (Wild & Gall, 1979). Durante su procesamiento, uno de los primeros eventos en la maduración del ARN_r, el intrón es escindido como una molécula lineal que luego se circulariza (Brehm & Cech, 1983). La remoción del intrón y ligación de los exones ocurren *in vitro* cuando el precursor es incubado en la presencia de guanosina y Mg²⁺, en la ausencia de proteínas (Cech *et al.*, 1981). Que esta actividad reside en el mismo ARN, y no en alguna proteína íntimamente asociada, se ha comprobado

rigurosamente, ya que precursores sintetizados por transcripción *in vitro* se autoescinden (Kruger *et al.*, 1982). La reacción ocurre por una serie de transesterificaciones en las cuales el número de uniones fosfodiéster se mantiene (Zaug *et al.*, 1983); por lo tanto, la reacción puede completarse sin una fuente exógena de energía. En la primera etapa, el 3'-hidroxilo de una guanosina que actúa como cofactor, es responsable del ataque nucleofílico a la unión que separa el exón 5' del intrón; esta unión es hidrolizada y una nueva se forma entre esta guanosina y el extremo 5' del intrón. En la segunda etapa, la unión entre el extremo 3' del intrón y el exón 3' es hidrolizada, y una nueva se forma entre los exones. En una tercera etapa, el intrón se circulariza; el 3'-hidroxilo de la guanosina del intrón ataca un grupo fosfato cerca del extremo 5' de la molécula, liberando un oligonucleótido (de 15 bases) y produciendo un ARN circular. Este proceso es reversible; oligonucleótidos ricos en pirimidinas pueden atacar el punto de circularización, linearizando la molécula y exponiendo el grupo 3'-hidroxilo de la guanosina terminal (Sullivan & Cech, 1985).

El análisis filogenético (Szostak, 1986) ha puesto en evidencia la existencia de una región conservada de aproximadamente 200 nucleótidos, esencialmente en el centro del intrón. Szostak ha demostrado que este centro se comporta como una verdadera enzima en el sentido que es capaz de catalizar la hidrólisis de un fragmento del pre-ARN_r que contiene solamente parte del exón 5' y parte del intrón; para esta reacción es necesario un residuo de guanosina como cofactor.

El intrón de *Tetrahymena* pertenece al Grupo I de intrones, definidos en base a la conservación de caracteres estructurales (Michel *et al.*, 1982). Varios de los intrones pertenecientes a este grupo son autoescindibles (van der

Horst & Tabak, 1985), incluyendo intrones mitocondriales (Michel & Cummings, 1985) y el intrón de la timidilato sintetasa del fago T₄ (Chu *et al.*, 1985). En todos estos casos, la escisión también ocurre por una serie de transesterificaciones. Algunos de ellos, sin embargo, requieren proteínas para escindirse (Wollenzien *et al.*, 1983); se ha especulado que las proteínas serían necesarias para conformar el ARN en la estructura correcta requerida para la escisión (Garriga & Lambowitz, 1984).

Procesamiento de ARN_m

Este es un proceso más complejo que probablemente refleje la mayor necesidad de mecanismos sutiles de control en la síntesis de proteínas. En procariotes, la evidencia de procesamiento de ARN_m es limitada; se encuentran ejemplos en los bacteriofagos Lambda (Lozeron *et al.*, 1976), T₄ (Pragai & Apirion, 1981) y T₇ (Dunn & Studier, 1973); en estos casos la enzima responsable de la remoción de secuencias en la molécula precursora es la ARNasa III. La acción sobre estos sustratos parece tener significado funcional; comparando las vidas medias de los ARN involucrados, se ha determinado que la acción de la ARNasa III estabiliza los mensajeros de T₇, pero torna más inestable el ARN_m del gen *int* de Lambda. Recientemente, se ha puesto en evidencia la existencia de un intrón en el ARN_m de la timidilato sintetasa del fago T₄ que es capaz de autoescisión (Chu *et al.*, 1985).

En eucariotes el panorama es muchísimo más complejo; los ARN_m son modificados después de su transcripción de maneras muy diversas. El término 5' de todos los mensajeros de eucariotes es modificado por el agregado de una estructura metilada de distintos grados de complejidad denominada "cap"

(Shatkin, 1976). Típicamente, se forma una unión 5'-5'-pirofosfato entre 7-metilguanosina y 2'-o-metilguanosina ó 2'-o-metiladenosina. En levaduras, el término 5' presenta sólo 7-metilguanosina. En mensajeros virales existe también metilación de la ribosa en el segundo nucleótido. La función de esta estructura es objeto de especulación; podría proteger el ARN de degradación por nucleasas, o podría ofrecer una señal de reconocimiento para el ribosoma.

En todos los mensajeros de eucariotes (excepto los de histonas), la formación del término 3' maduro se lleva a cabo a través de un corte endonucleolítico que expone el sitio poli(A), y el consiguiente agregado de 150-200 residuos de adenosina (Birnstiel *et al.*, 1985). La secuencia AAUAAA localizada 10-30 nucleótidos antes del sitio poli(A) parece ser crucial para el procesamiento eficiente (Gil & Proudfoot, 1984). Muy recientemente, Keller (Christofori & Keller, 1988) ha conseguido separar los factores involucrados en este proceso en células HeLa; ellos son: (1) una poli(A) polimerasa de peso molecular 50-60.000; (2) una enzima hidrolítica de peso molecular 70-120.000; y (3) un factor que denominan CPF que es necesario para la hidrólisis y además confiere especificidad a la poli(A) polimerasa; este último es una ribonucleoproteína que copurifica con el ARN U₁₁. En algunos genes, términos 3' diferentes pueden resultar del procesamiento, permitiendo la síntesis de proteínas diferentes (Leff *et al.*, 1986).

Uno de los mecanismos de procesamiento de ARN_m más fascinantes es el existente en el mensajero de la subunidad III de la citocromo c oxidasa en *Trypanosoma* (Feagin *et al.*, 1988). En este ARN, 60% de los nucleótidos (determinados por su secuenciación) son residuos de uridina que no se encuentran codificados en el ADN; estos residuos son agregados

posttranscripcionalmente. Este proceso ha sido denominado "edición" de ARN. No se conoce cuáles son las señales que inician este proceso; la única observación es que la cadena que será editada contiene un número inusualmente elevado de residuos de guanosina. Este proceso se ha descrito hasta ahora en 5 mensajeros de especies de *Trypanosoma*; en 4 de ellos el codon de iniciación AUG no se encuentra en el mensajero y es consecuencia del proceso de edición (Shaw *et al.*, 1988).

El uso de "splicing" (la escisión de intrones y concomitante ligación de los exones para generar el mensajero maduro) presta enorme versatilidad al procesamiento de ARN_m, permitiendo no sólo la generación de mensajeros diferentes sino también esquemas sofisticados de regulación. Un ejemplo es el gen mitocondrial para el citocromo *b* en levaduras (Lazowska *et al.*, 1980). Este gen contiene 4 intrones y regiones que codifican 2 proteínas diferentes. Los 2 primeros exones y parte del segundo intrón codifican una enzima, ARN maturasa, que a su vez escinde el segundo intrón y permite así la generación del ARN_m maduro.

La escisión de intrones es de particular interés ya que en este proceso intervienen una serie de moléculas de ARN estables y de cadena corta (los ARN U), complejadas con proteínas (Steitz *et al.*, 1988). La remoción de intrones ocurre en dos etapas, ambas transesterificaciones (Cech & Bass, 1986). Primero, el clivaje en el límite 5' del intrón está acompañado por la formación de una unión entre el 5'-fosfato del extremo y el 2'-hidroxilo de un residuo de adenosina cercano al término 3' del intrón, formando una estructura llamada "lariat". La segunda etapa es el clivaje del límite 3' y la concomitante ligación de los exones y liberación del intrón en forma de lariat (Padgett *et al.*, 1986). Los elementos de reconocimiento están determinados

en la estructura del intrón (Guthrie, 1988). Existen secuencias altamente conservadas a ambos límites del intrón (Aebi *et al.*, 1986), así como en el sitio de formación de la unión 2'-5' característica del lariat (Reed & Maniatis, 1985). La importancia de estas secuencias ha sido puesta de manifiesto por análisis mutacional (Guthrie, 1988). Por otro lado, la delección de grandes regiones del intrón fuera de estos dominios conservados, en general no afecta la reacción (Sharp, 1987). Estas secuencias conservadas interaccionan específicamente con los ARN U; el ARN U₁ reconoce el límite 5' (Krämer *et al.*, 1984), mientras que el ARN U₂ reconoce la secuencia que señala el sitio de formación del lariat (Black *et al.*, 1985). Además de participar en el reconocimiento de secuencias en el sustrato, los ARN U podrían cumplir funciones catalíticas, por analogía con algunos intrones del Grupo II.

Este es un grupo reducido de intrones en genes mitocondriales que difieren en secuencias conservadas y en estructura secundaria de los intrones del Grupo I. La escisión de estos intrones es semejante mecanísticamente a los de mensajeros (Michel & Dujon, 1983). Uno de los intrones de este grupo, el último intrón del pre-ARN_m para la citocromo oxidasa mitocondrial de levaduras, se autoescinde (Peebles *et al.*, 1986). Esta reacción requiere espermidina (supuestamente para estabilizar la estructura del ARN), y no necesita guanosina ni ningún otro nucleótido como cofactor. El intrón es escindido en forma de lariat.

Kruger y colaboradores (Kruger *et al.*, 1982) han especulado que es posible que el procesamiento de intrones de mensajeros sea semejante a la autoescisión; la diferencia residiría en el hecho que en el primer caso el ARN catalítico actuaría en *trans* (presente en las ribonucleoproteínas), mientras que en segundo caso actuarían en *cis* (el mismo intrón). Sin embargo, el

procesamiento de intrones en mensajeros requiere proteínas, así como ARN; en ese sentido podría ser análogo al caso de la ARNasa P, en la cual el ARN contiene el sitio activo, mientras que la proteína cumple funciones auxiliares.

Procesamiento de ARN_t

Los ARN_t proveen un modelo sencillo para el estudio del procesamiento de ARN ya que se trata de moléculas relativamente pequeñas, muy diseminadas y de estructura uniforme. Sin embargo, los eventos implicados en este proceso ocurren inmediatamente después de la transcripción y por lo tanto no existe acumulación de precursores, y éstos son difíciles de aislar *in vivo*. La nueva tecnología de clonado de genes en vehículos de expresión (Melton *et al.*, 1984) permite ahora la síntesis *in vitro* de precursores, y resulta un arma poderosa en la batalla para elucidar los mecanismos moleculares responsables de la maduración de los ARN_t.

En eucariotes, los genes para ARN_t se encuentran diseminados en grupos en el genoma; sólo se han observado precursores monoméricos o diméricos (Kubli, 1981). En procariotes, la organización de estos genes es muy variada; pueden ocurrir como genes aislados o en grupos de 2 ó más (y hasta 21) genes que son cotranscritos (Green & Vold, 1983). En estos precursores multiméricos, los genes pueden ser idénticos, como es el caso del tetrámero ARN_t^{Leu} en *E. coli* (Schedl *et al.*, 1975), o todos diferentes, como en el grupo mayor en *B. subtilis* (Green & Vold, 1983). Además, algunos ARN_t son cotranscritos con ARN_r, ya sea entre los 16S y 23S o más allá del extremo 5' del 5S (Loughney *et al.*, 1982; Morgan *et al.*, 1978)).

La maduración de estos precursores incluye la ruptura endonucleolítica que resulta en la separación de los diferentes dominios y reduce el tamaño del transcrito primario, y la generación de los términos 5' y 3' maduros por eventos endo- y exonucleolíticos. Además, la secuencia CCA es agregada al término 3' si es necesario, el intrón en el anticodon es eliminado si éste existe, y las necesarias modificaciones químicas a bases o residuos de ribosa son efectuadas.

Poco se conoce de los primeros eventos que resultan en la separación de los diferentes dominios de ARN_t . Dos de los casos mejor estudiados son los ARN_t cotranscritos con ARN_r y el cistrón de ARN_t del fago T4; en ambos casos la enzima responsable es la ARNasa III (Lund *et al.*, 1980; McClain, 1979); sin embargo el producto de esta catálisis no son las especies maduras, sino que éstas son generadas luego de la maduración de los términos 3' y 5'.

La presencia de un intrón en la región del anticodon de precursores de ARN_t de eucariotes es muy frecuente (Johnson & Abelson, 1983); éstos también ocurren en algunos ARN_t de arqueobacterias (Kaine *et al.*, 1983). La remoción de estos intrones es el paso final en el procesamiento de ARN_t (Melton *et al.*, 1980). Las numerosas modificaciones químicas características de los ARN_t ocurren durante todo el proceso de maduración (Bjork *et al.*, 1987).

A continuación se trata en más detalle el procesamiento de los términos 3' y 5' de los precursores de ARN_t .

Maduración del término 3'

Los precursores de ARN_t en distintos organismos difieren en cuanto a las secuencias transcriptas al término 3'. Por ejemplo, en *E. coli* todos los ARN_t poseen CCA (Deutscher, 1982); en *B. subtilis* sólo 70% de los ARN_t codifican esta secuencia en sus transcritos primarios (Green & Vold, 1983); en el bacteriófago T₄, que codifica 8 ARN_t, 4 de ellos necesitan la adición posttranscripcional de CCA (Fukada & Abelson, 1980); se han secuenciado genes de ARN_t en arqueobacterias que no contienen CCA (Kaine *et al.*, 1983). En eucariotes, la situación es más uniforme ya que todos los genes de ARN_t secuenciados hasta ahora, tanto en el núcleo como en organelas, no poseen CCA (Deutscher, 1982).

Deutscher y colaboradores han definido 2 tipos de ARN_t inmaduros en sus términos 3' (Deutscher, 1982); la clase I, que incluye todos los de *E. coli*, contienen CCA seguido por otros nucleótidos; la clase II no contiene esta secuencia, pero sí otras que deben ser escindidas antes que la enzima nucleotidiltransferasa agregue CCA. La enzima responsable de la remoción de residuos en el término 3' de los ARN_t pertenecientes a la clase I es la ARNasa D; es una enzima exonucleolítica que ha sido purificada a homogeneidad (Cudny *et al.*, 1981a). La ARNasa D rompe la unión fosfodiéster en forma secuencial, disociándose del sustrato luego de cada evento nucleolítico (Cudney *et al.*, 1981b). Cuando el término CCA maduro está expuesto, la velocidad de la reacción disminuye por un factor de 30; esta disminución permite el acceso al término 3' de la enzima aminoacil-ARN_t sintetasa. La ARNasa D no reconoce la secuencia CCA en sí, ya que ARN_t que terminan en CCC ó CCU se comportan de la misma manera; probablemente es la estructura terciaria del ARN_t la que determina el cambio en la velocidad de la reacción. Los

precursores de la clase II son procesados por la enzima ARNasa BN, también de actividad exonucleolítica (Asha *et al.*, 1983). Recientemente, se ha demostrado que cepas de *E. coli* mutantes para las ARNasas II, T, D y BN aún son capaces de procesar el término 3' de los pre-ARN_t correctamente; la actividad responsable es fosforolítica y es cuestionable si es realmente la actividad responsable de la generación del término 3' maduro *in vivo*, o si representa un camino metabólico alternativo puesto en evidencia en el mutante múltiple (Cudney & Deutscher, 1988).

Todos los precursores de la clase II requieren la acción de la enzima nucleotidiltransferasa, que agrega CCA luego de la remoción de los nucleótidos superfluos. Esta enzima ha sido identificada en todos los sistemas eucariotes investigados hasta el presente (Deutscher, 1982). También se encuentra en *E. coli*, donde no es requerida para la maduración de precursores; aparentemente, en este organismo esta enzima funciona en la reparación de moléculas de ARN_t dañadas (Deutscher *et al.*, 1977). No muestra distinta especificidad por los distintos sustratos, y por lo tanto parece reconocer no estructura primaria, sino estructura terciaria, como las ARNasas D y BN.

Maduración del término 5'

Los ARN_t de todos los organismos, independiente de su grado de complejidad, son procesados en el término 5'. La única excepción (Gupta, 1984) es el ARN_t^{Met} iniciador de *Halobacterium volcanii*, una arqueobacteria, que posee un grupo trifosfato en el término 5', indicativo del hecho de ser producto primario de la transcripción. La actividad responsable de madurar el extremo 5' de los ARN_t es la enzima ARNasa P.

La enzima ARNasa P

Además de madurar el extremo 5' de los ARN_t, esta enzima también funciona en la maduración de otros ARN de bajo peso molecular (Bothwell *et al.*, 1976), incluyendo el ARN 4,5S, cuya significancia en la iniciación de la síntesis de proteínas ha sido puesta de manifiesto recientemente (Bourgaize & Fournier, 1987). A pesar de haber sido identificada en 1971 en extractos crudos de *E. coli* (Altman & Smith, 1971) y purificada parcialmente un año más tarde (Robertson *et al.*, 1972), fue sólo en 1978 que fue estudiada exhaustivamente en este organismo (Stark *et al.*, 1978). La enzima presenta propiedades cromatográficas muy peculiares, ya que la actividad se eluye a alta fuerza iónica de resinas cargadas positivamente (DEAE-celulosa), a pesar de ser la proteína de carácter básico; en gradientes de CsCl, la actividad se recupera a una densidad de 1,72 g/ml, intermedia entre las densidades correspondientes a proteínas y a ARN; es posible inactivar la enzima tanto por tratamiento con ribonucleasas como proteasas. Estas peculiaridades se deben al hecho de presentar dos componentes, uno proteico (la proteína C5) y uno ribonucleico (el ARN M1), ambos esenciales (Stark *et al.*, 1978). La naturaleza ribonucleoproteica de esta enzima es de amplia distribución filogenética. *B. subtilis* también posee una enzima similar (Gardiner & Pace, 1980). La presencia de un componente ribonucleoproteico no está restringida a procariotes; la ARNasa P de eucariotes tales como *Schizosaccharomyces pombe* (Krupp *et al.*, 1986) o las enzimas homólogas del núcleo y mitocondrias de células humanas (Koshi *et al.*, 1976; Doersen *et al.*, 1985) también son ribonucleoproteínas. Sin embargo, no necesariamente es la enzima una ribonucleoproteína; en ovocitos de *Xenopus laevis* la actividad

responsable de la maduración del término 5' es exclusivamente proteica (Castaño *et al.*, 1986). Las únicas enzimas bien caracterizadas hasta el momento son las de eubacterias, específicamente *E. coli* y *B. subtilis*, y en éstas, ambos componentes son esenciales y necesarios para la catálisis *in vivo*.

Los componentes de la ARNasa P de *E. coli* y *B. subtilis* son similares en sus propiedades generales. Las proteínas son de naturaleza básica y de peso molecular entre 14,000 y 17,000 (Hansen *et al.*, 1985, Ogasawara *et al.*, 1985); las proteínas de ambos organismos pueden complementarse recíprocamente en ensayos *in vitro* (Guerrier-Takada *et al.*, 1983), lo cual implica que cumplen funciones homólogas. La proteína C5 de *E. coli* está codificada por el gen *rnpA*, que se encuentra cercano al origen de replicación *ori* en el cromosoma. Esta región ha sido clonada (Moriya *et al.*, 1985) y su secuencia ha sido determinada. En este cistrón el primer gen codifica la proteína ribosomal L34; el segundo gen es *rpnA*, y a continuación existen dos posibles genes. La secuencia y peso molecular de la proteína en *B. subtilis* son inferidos de la correlación de la región estructuralmente homóloga en el cromosoma (Ogasawara *et al.*, 1985). Esta conjetura está sustanciada por el hecho que plásmidos conteniendo esta secuencia son capaces de complementar mutantes termosensibles en la proteína de la ARNasa P (proteína P). La proteína C5 de *E. coli* es purificada esencialmente a homogeneidad haciendo uso de una columna de afinidad en la cual ARN M1 es acoplado covalentemente a un soporte de agarosa; la proteína se eluye con 7 M LiCl, 10 mM EDTA (Vioque & Altman, 1986). En el caso de *B. subtilis*, el esquema de purificación de la proteína P involucra el aislamiento de ribonucleoproteínas por cromatografía en DEAE-celulosa, extracción de la porción proteica con ácido acético 67% y posterior cromatografía en

carboximetil- y sulfonil-Trisacryl (B. Pace, resultados no publicados). Los rendimientos son adecuados cuando se considera que esta proteína es escasa (50-100 moléculas/célula).

El componente ribonucleico de la ARNasa P

El componente ribonucleico de la ARNasa P de *E. coli* (Reed *et al.*, 1982; Sakamoto *et al.*, 1983a) y el de *B. subtilis* (Reich *et al.*, 1986; esta tesis), consisten de aproximadamente 400 nucleótidos. En el curso de estudios para determinar las condiciones iónicas óptimas para la reacción *in vitro*, fue puesto en evidencia el carácter catalítico del ARN (Guerrier-Takada *et al.*, 1983). Este hecho, inusual e interesante, plantea innumerables preguntas pertinentes al carácter, estructura y función de esta molécula. Esta tesis es resultado de ello.

In vivo y en condiciones fisiológicas *in vitro*, ambos componentes son necesarios para efectuar catálisis. Sin embargo, a altas concentraciones de cationes mono- y divalentes, el ARN por sí solo es capaz de procesar correctamente moléculas precursoras. Que el ARN es el componente catalítico ha sido rigurosamente demostrado en *E. coli* (Guerrier-Takada & Altman, 1984b) y en *B. subtilis* (Reich *et al.*, 1986; esta tesis); el producto de la transcripción *in vitro* de los genes respectivos, clonados en vehículos de expresión adecuados, en la total ausencia de proteínas en el medio de reacción, son activos catalíticamente.

La reacción requiere metales divalentes, típicamente Mg^{2+} ; Mn^{2+} es el único ion que puede sustituirlo; Zn^{2+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} y Sr^{2+} no son capaces de promover catálisis (Gardiner *et al.*, 1985). Se ha propuesto que un ion Mg^{2+}

se compleja en el sitio catalítico y que uno de los hidroxilos coordinados es el nucleófilo que promueve la catálisis (Guerrier-Takada *et al.*, 1986).

El requerimiento de altas concentraciones de cationes, típicamente 100 mM MgCl₂, 800 mM NH₄Cl, diferencia a este ARN de los ARN autocatalíticos, que son activos en condiciones de baja fuerza iónica (Bass & Cech, 1984). Considerando que el ARN P interviene en una reacción intermolecular, en contraposición al reordenamiento intramolecular que experimentan los ARN autocatalíticos y los intrones que se autoescinden, es lógico suponer que la presencia de cationes es necesaria para contrarrestar la repulsión electrostática existente entre el ARN enzimático y el ARN sustrato (los pre-ARN_t). Algunos datos son inconsistentes con esta interpretación o, al menos, parecen indicar que la presencia de cationes cumple funciones más allá de las puramente electrostáticas. Si el efecto fuera sólo electrostático, se esperaría que los cationes de menor radio fueran más efectivos que los de mayor radio a menores concentraciones; esto se debe a que los cationes pequeños se complejan más fuertemente que los de mayor radio con los grupos fosfato de los ácidos nucleicos, siguiendo el orden Li⁺ > Na⁺ > K⁺ > Rb⁺ > Cs⁺ (Ross & Scruggs, 1964). Se ha demostrado que el orden de efectividad en el cual los diferentes cationes promueven catálisis por el ARN P en *B. subtilis* es Rb⁺, Cs⁺, K⁺, NH₄⁺ > Li⁺, Na⁺ (Gardiner *et al.*, 1985).

Algunos datos experimentales parecen indicar que transiciones conformacionales en sustrato y/o enzima juegan un papel importante en la catálisis por ARN (Gardiner *et al.*, 1985; Altman & Guerrier-Takada, 1986). Por ejemplo, la presencia de agentes desnaturizantes en el medio de reacción (tales como etanol, dimetilsulfóxido y etilenglicol) disminuye las concentraciones de cationes necesarias para observar catálisis, con respecto a

las necesarias en medio acuoso. Si bien esto parece indicar la importancia de la fluidez en términos conformacionales de las moléculas en cuestión, estos resultados pueden también ser interpretados desde el punto de vista electrostático. Estos solventes, al reducir la constante dieléctrica del medio de reacción, aumentarían el potencial de interacción electrostática, de acuerdo a la ley de Coulomb. Por lo tanto, los cationes se complejarían con los polinucleótidos más eficientemente y podrían ejercer su influencia a menores concentraciones.

El ARN P, como la mayoría de las enzimas que intervienen en el procesamiento de los ARN y los intrones autoescindibles, genera grupos 5'-fosfato y 3'-hidroxilo en el sitio de clivaje. Sin embargo, el mecanismo de reacción del ARN P es fundamentalmente diferente. En los intrones del grupo I, las reacciones son iniciadas con el ataque nucleofílico por el grupo 3'-hidroxilo de un residuo de guanósina (Kruger *et al.*, 1982); el ARN P no funciona de esta manera ya que no requiere guanósina como cofactor (Marsh & Pace, 1985). El segundo paso en la escisión de estos intrones es el ataque nucleofílico al límite intrón-exón 3' por la guanósina agregada al término 5' del intrón en la primera etapa; consistente con esto se ha demostrado que la modificación de este residuo impide la reacción (Garriga *et al.*, 1986). En el caso del ARN P, la oxidación de los términos 3' tanto del ARN enzima como del ARN sustrato usando periodato, que destruye los grupos 2'- y 3'-hidroxilo, no inactiva la enzima (Marsh & Pace, 1985). El ARN P así tratado no puede actuar como sustrato para la enzima ARN ligasa del fago T₄, que agrega polinucleótidos de por lo menos 3 bases al término 3' del ARN; esto demuestra que el término 3' no puede participar en uniones fosfodiéster, y por ende ha sido oxidado completamente.

En los intrones del grupo II, el ataque nucleofílico inicial sobre la ligadura que separa exón de intrón ocurre via un grupo 2'-hidroxilo, generando un complejo covalente, el *lariat* (Sharp, 1987). Hasta el presente, la búsqueda por una asociación covalente entre el ARN P y el precursor, tanto en *E. coli* (Guerrier-Takada *et al.*, 1986) como en *B. subtilis* (T.L. Marsh & D.S. Waugh, resultados no publicados), no ha arrojado datos positivos. Estos resultados, aunque negativos, hacen parecer como más probable que el ataque nucleofílico inicial ocurra por intermedio de una molécula de agua. Esta especulación encuentra sustanciamiento en el hecho que la velocidad de reacción del ARN P no es proporcional a la concentración de iones hidroxilo (Marsh & Pace, 1985; Guerrier-Takada *et al.*, 1986).

Reconocimiento del sustrato

Dado el hecho que es una sola enzima la que procesa el término 5' de todos los precursores de ARN_t, desde un principio se especuló sobre el mecanismo de reconocimiento de sus sustratos (Altman, 1978). Schmidt y colaboradores observaron que, mientras precursores diméricos son procesados eficientemente, oligómeros aislados que contienen los sitios de clivaje naturales no son procesados en absoluto (Schmidt *et al.*, 1976). El precursor Pro-Ser del fago T₄ fue digerido con la ribonucleasa T₁ y el oligonucleótido conteniendo la región limítrofe entre los dos ARN_t fue aislado; en condiciones en que más del 40% del precursor entero es procesado, no es posible detectar actividad sobre el fragmento. Este resultado parece indicar que los elementos de reconocimiento se encuentran en la estructura secundaria y terciaria del dominio maduro del ARN_t. A pesar de ello, la enzima exhibe una gran tolerancia con respecto a ciertos elementos (Schimmel, 1981), tales como la presencia de un intrón adyacente al anticodon, diferencias en el tamaño del

loop variable (que puede estar compuesto de 4 a 21 nucleótidos) o variaciones menores en el *loop* D; además las secuencias específicas del precursor pueden ser largas y desestructuradas, como los 41 nucleótidos en el ARN_t^{Tir} de *E. coli* (Altman & Smith, 1971), o pueden no existir por completo, como en el caso del dímero Gln-Leu del fago T₄ (Guthrie, 1975). En los tres primeros casos, es probable que estas variaciones no modifiquen considerablemente la estructura terciaria del dominio maduro. Sin embargo, compensar por el impedimento estérico debido a secuencias específicas del precursor no debe ser trivial. Una indicación del grado de sofisticación de los mecanismos de reconocimiento la da el mapeo con nucleasa S₁ del dímero Gln-Leu del fago T₄ (Manale *et al.*, 1979). La zona correspondiente al sitio de acción de la ARNasa P es totalmente refractaria a la nucleasa S₁; esto implica que la región es de doble hélice, o que el sitio se encuentra inmerso entre los dos ARN_t, y por lo tanto inaccesible. De cualquier manera, la ARNasa P debe "descubrir" este sitio, probablemente relajando parcialmente la estructura terciaria en esa región.

Influencia de la secuencia 3' CCA

En la mayoría de los ARN_t de eubacterias, una de las secuencias disponibles para la interacción entre enzima y sustrato es el 3' CCA. En la estructura terciaria, esta secuencia se encuentra en la vecindad de la unión química clivada por la ARNasa P, y es razonable suponer que su presencia, o no, influye en el procesamiento del término 5'. En *E. coli*, todos los genes de ARN_t codifican el término 3' CCA; pero la situación no es universal a todos los procariotes; en *B. subtilis*, la tercera parte de los ARN_t no la codifican (Green & Vold, 1983), y debe ser agregada posttranscripcionalmente por la enzima nucleotidiltransferasa (Deutscher *et al.*, 1974). En el fago T₄, cuyos

pre-ARN_t carecen de esta secuencia (Deutscher *et al.*, 1974), McClain y colaboradores han demostrado que *in vivo*, el término 3' CCA es agregado antes de la maduración del término 5' por la ARNasa P (Schmidt & McClain, 1978).

McClain y colaboradores han observado que la presencia del 3' CCA afecta la velocidad de la reacción de la ARNasa P de *E. coli* (Seidman & McClain, 1975). El fago T₂ codifica un ARN_t dimérico Pro-Ser idéntico al de T₄, excepto por la presencia de CCA en el monómero correspondiente a serina. Si células mutantes en el gen que codifica la ARNasa BN (que interviene en el procesamiento del término 3', como se ha discutido anteriormente) son infectadas con el fago T₄, es posible aislar el dímero de ARN_t Pro-Ser carente de CCA. El ensayo de la actividad enzimática de la ARNasa P sobre estos dos sustratos, demuestra que en condiciones en que el dímero con CCA es procesado con una eficiencia del 90%, sólo el 10% del dímero sin CCA es clivado.

Altman y sus colegas (Guerrier-Takada *et al.*, 1984) demostraron que los precursores que carecen del 3' CCA son clivados *in vitro* muy ineficientemente por el ARN P de *E. coli*; los precursores sin CCA son generados por tratamiento de precursores normales (en todos los cuales existe CCA) con la enzima fosfodiesterasa de veneno de serpiente. Cuando la proteína C5 purificada (equivalente a la proteína P) se agrega al medio de reacción para reconstituir la holoenzima, ambos tipos de precursores (con o sin CCA) son clivados con la misma eficiencia. Sin embargo, es conocido actualmente el hecho que distintos precursores tienen diferentes condiciones iónicas óptimas para su clivaje (Vold & Green, 1988; Reich *et al.*, 1987), y estos resultados deben reexaminarse a la luz de condiciones iónicas diferentes.

Estructura secundaria del ARN P

Para elucidar el mecanismo de acción del ARN P, será necesario obtener información acerca de su estructura secundaria. Esta información permitirá interpretar coherentemente experimentos en los cuales el ARN es mutagenizado y la actividad de las moléculas mutantes es evaluada; así podrán identificarse regiones de la molécula importantes funcionalmente. En 1984, Guerrier-Takada y Altman propusieron un modelo de estructura secundaria para el ARN M1, basado en estudios de sensibilidad a enzimas hidrolíticas (mapeo enzimático) (Guerrier-Takada & Altman, 1984a). El modelo fue derivado de los resultados de digestiones parciales con las ribonucleasas A y T₁, y nucleasa S₁, que clivan preferentemente regiones de cadena simple; y la ribonucleasa del veneno de cobra que muestra preferencia por regiones de doble cadena (Wurst *et al.*, 1978). Los autores comentan sobre las similitudes entre este modelo y el generado computacionalmente (Reed *et al.*, 1982), pero no todas las estructuras propuestas son coherentes con los datos enzimáticos.

Los métodos computacionales tratan de predecir cuál estructura secundaria, de todas las posibles, es la más favorable energéticamente. Estos cálculos se basan en estimaciones de energías libres para los distintos pares de bases y para diversas estructuras, tales como *loops* y regiones apicales de cadena simple (Tinoco *et al.*, 1973; Salser, 1977; Cech *et al.*, 1983; Turner *et al.*, 1987). Sin embargo, estos métodos no están bien desarrollados; por ejemplo, las reglas de Salser (Salser, 1977) predicen la estructura de "trébol" correcta de los ARN_t sólo el 50% de las veces (Ninio, 1979); de forma similar, sólo la mitad de las hélices predichas para el ARN 16S son correctas (Noller & Woese, 1981). Las razones para estos fracasos son varias. Por ejemplo, las estimaciones de las energías libres para los distintos pares de bases son

inexactas, y provienen de estudios de oligonucleótidos en condiciones muy específicas *in vitro*. El problema es aún más complejo cuando se trata de estimar la contribución energética que proveen los pares de bases no canónicos (tales como A-C y A-G) que se sabe existen *in vivo*. Tampoco es posible hasta ahora tratar termodinámicamente estructuras tales como discontinuidades en regiones de doble cadena o el efecto del contexto en el cual un determinado par de bases está inmerso. Si bien los últimos métodos computacionales desarrollados predicen con bastante confianza las interacciones a corta distancia (entre regiones contiguas en la estructura primaria), todos sin excepción fallan cuando se trata de predecir interacciones secundarias entre regiones alejadas de una molécula (B.D. James *et al.*, 1988b).

Aunque estas predicciones son inexactas, proveen sin embargo un modelo para la experimentación. El mapeo enzimático o químico puede definir regiones de cadena simple o doble (Vournakis *et al.*, 1981); sin embargo, no distingue los componentes de las hélices, y en muchos casos los datos son difíciles de interpretar ya que la susceptibilidad a agentes químicos o nucleasas depende también de la estructura terciaria de la molécula (Peattie & Herr, 1981; Holbrook & Kim, 1983).

El mejor método *a priori* para elucidar estructuras secundarias es el de comparación filogenética (Fox & Woese, 1975; Noller & Woese, 1981). Suscintamente, el método consiste en comparar moléculas homólogas en distintos organismos en los cuales la secuencia primaria ha divergido. Las posibles hélices en un ARN, indicadas por secuencias complementarias, se buscan en las regiones correspondientes de la otra molécula. La presencia de regiones de doble cadena está indicada por la covariación de las bases

complementarias; las sustituciones de nucleótidos se compensan de tal manera de preservar la capacidad de formar una hélice.

Las ARNasas P de *E. coli* y *B. subtilis* llevan a cabo la misma reacción y las proteínas y ARN de ambos organismos pueden complementarse mutuamente y reconstituir enzimas heterólogas que retienen actividad (Guerrier-Takada *et al.*, 1983). Por lo tanto, los elementos estructurales en el ARN responsables de la catálisis *per se* y de la interacción con el componente proteico y con el sustrato deben ser similares. La comparación de las secuencias de ambos ARN puede por lo tanto ayudar en elucidar la estructura secundaria de este ARN catalítico. La secuencia para el ARN P de *E. coli* ha sido determinada (Reed *et al.*, 1982; Sakamoto *et al.*, 1983a). La secuencia en *B. subtilis* también es conocida (Reich *et al.*, 1986; esta tesis). Durante el curso de estos estudios, las secuencias en otros organismos han sido publicadas (Baer & Altman, 1985; James *et al.*, 1988a). Esta información permite la comparación de secuencias de organismos suficientemente diversos como para proveer una base sólida al análisis comparativo.

MATERIALES Y METODOS

Abreviaturas

A = adenina

Asp = ácido aspártico

C = citidina

cpm = cuentas por minuto

DEAE = dietilaminoetil (celulosa)

DMSO = dimetilsulfóxido

DTT = ditioneitol

EDTA = etilendiaminotetraacetato (disódico)

EtBr = bromuro de etidio

G = guanidina

His = histidina

IPTG = isopropil- β -D-tiogalactopiranosido

Leu = leucina

NP40 = nonidet P40 (Sigma)

OD = densidad óptica

pCp = citosina 5',3'-bifosfato

PEG = polietilenglicol

pfu = *plaque forming units* (partículas virales capaces de formar placas de lisis)

SDS = dodecilsulfato de sodio

T = timidina

Tris = trishidroximetilaminometano

U = uridina

X-Gal = 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

Materiales

Los medios de cultivo son de Difco. Las enzimas comerciales, cuando no se especifica lo contrario, son de New England Biolabs. Reactivos para electroforesis en geles de poliacrilamida son de Eastman. Agarosas son de International Biotechnology Inc. Nucleótidos y análogos son de Pharmacia. Sustancias radiactivas son de New England Nuclear.

Soluciones y medios de cultivo

BBA = por litro, 10 g triptona / 10 mg tiamina / 8 g NaCl / 12 g agar

50x Denhardt = por litro, 10 g polivinilpirrolidona / 10 g seroalbúmina bovina / 10 g ficoll

E = 40 mM Tris (base) / 20 mM NaOAc / 2 mM EDTA

LB = por litro, 10 g triptona / 5 g extracto de levadura / 8 g NaCl

10x NNB = por litro, 162 g Tris (base) / 27,5 ácido bórico / 9,3 g EDTA

PA = 50 mM Tris-HCl pH 7,3 / 60 mM NH₄Cl / 10 mM MgCl₂ / 0,1 mM DTT / 5% glicerol

10x SSC = 1,5 M NaCl / 0,15 M citrato de sodio

TBE = 50 mM Tris (base) / 50 mM ácido bórico / 1 mM EDTA

STE = TE + 100 mM NaCl

TE = 10 mM Tris-HCl pH 8,0 / 1 mM EDTA

10x TMS = 0,1 M Tris-HCl pH 8,0 / 100 mM MgCl₂ / 10 mM DDT

2x YT = por litro, 16 g triptona / 10 g extracto de levadura / 5 g NaCl

Electroforesis en geles de agarosa

Los geles de agarosa se corren en buffer E a 10 V/cm hasta que el indicador azul de bromofenol alcanza el borde inferior. Geles preparativos (de los cuales se quiere eluir algún fragmento) son de 3 mm de espesor y verticales. Geles analíticos son horizontales.

Electroforesis en geles de poliacrilamida

Para aislar fragmentos de ADN, los geles que se utilizan son de 5% acrilamida (0,25% bis-acrilamida) en buffer TBE; los geles se corren a 10 V/cm hasta que el indicador azul de bromofenol llega al borde inferior. Los geles se tiñen en 2 µg/ml bromuro de etidio. Para aislar ARN, los geles son de 8% acrilamida (0,4 % bis-acrilamida) / 8 M urea, en el mismo buffer; en este caso los geles se corren a 50 V/cm hasta que el azul de bromofenol llega al borde inferior.

Purificación del ARN P

50 g peso húmedo de células congeladas de *B. subtilis* 168 fueron descongeladas y resuspendidas en 50 ml de buffer PA conteniendo 100 µg/ml ADNasa y 0,5 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo. Las células se pasan dos veces por una prensa de French a 20.000 *psi*. Luego de centrifugar por 20 min a 20.000 rpm, el sobrenadante se lleva a 0,22 M NH₄Cl, se mantiene a 0°C por 30 min y se centrifuga a 45.000 rpm durante 2 horas a 2°C. Este sobrenadante se extrae 3 veces con fenol y el ARN se precipita con etanol. El precipitado se disuelve a una concentración de 7 mg/ml en buffer TE. 5 ml de esta solución se pasan por una columna de Sephadex G-150 (95 x 2,2 cm), equilibrada con STE. Las fracciones que contienen el ARN P (determinadas según su capacidad de complementar la proteína P en la reacción *in vitro*) se colectan y precipitan con etanol. Luego de resuspender el precipitado en TE, esta fracción ribonucleica se corre en geles de poliacrilamida (5% acrilamida, 8 M urea) en TBE. Las bandas identificadas por fluoroscopia ultravioleta (Hassur & Whitlock, 1974) son eluidas pasivamente en TE. La especie correspondiente al ARN P se identifica en la reacción enzimática *in vitro*.

Síntesis y purificación de desoxioligonucleótidos

Los desoxioligonucleótidos utilizados en este estudio fueron sintetizados automáticamente en un sintetizador de ADN de Applied Biosystems. La purificación final se hace en geles de poliacrilamida del 20% con 8 M urea de 1,5 mm de espesor que se corren a 35 Watts. La banda, visualizada por fluoroscopia ultravioleta, se eluye pasivamente en TE. La elución se lleva a 50 mM NH₄OAc y se pasa a través de una minicolumna Bond-Elut C8

(cromatografía de fase contraria), y el oligonucleótido se eluye con 50% acetonitrilo. Luego de liofilizar el producto al vacío, se resuspende en TE y se mantiene a -20°C .

Síntesis de una sonda radiactiva con transcriptasa inversa

Con el objeto de detectar clones recombinantes que contengan las secuencias que codifican el ARN P, en los primeros estadios de estos estudios se utilizó como sonda (*probe*) radiactiva el ARN P purificado de células y marcado en el término 3' con $[5'\text{-}^{32}\text{P}]\text{-pCp}$ (citosina 5',3'-bifosfato) y la enzima ARN ligasa del fago T₄. El ARN así marcado se purifica en geles de poliacrilamida (5% con 8 M urea); la región correspondiente al ARN se localiza por autoradiografía y el ARN se eluye pasivamente en TE, y se colecta finalmente por precipitación con etanol. Este método es ineficiente, laborioso y da lugar a artefactos durante las hibridaciones, ya que el ARN P purificado de células está contaminado con fracciones de ARN ribosomal. Luego de los primeros intentos de secuenciar este ARN por métodos químicos (B. Pace, resultados no publicados), suficiente información fue obtenida para sintetizar un oligonucleótido (de 15 residuos) complementario al ARN cerca del término 3'. Este oligonucleótido es utilizado como *primer* para sintetizar un cADN usando como templado el ARN P purificado y la enzima transcriptasa inversa (del virus de mieloblastoma avícola, de Seikagaku, Ltd), en la presencia de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$. Típicamente, 250 ng del *primer* se incuban con 1 μg de ARN P en un volumen de 5 μl , conteniendo 50 mM KCl / 25 mM Tris-HCl pH 8,5, a 90°C por 1 min; la mezcla se deja enfriar lentamente durante un período de 10 min hasta 25°C . A ella se agregan 300 μCi de $[\alpha\text{-}$

^{32}P]dATP (actividad específica = 3.000 Ci/mmol), 3,5 μl de 5x buffer (250 mM Tris-HCl pH 8,3 / 250 mM KCl / 50 mM DTT / 50 mM MgCl_2), 7 μl de una mezcla de dGTP, dCTP y TTP todos ellos a una concentración de 1 mM, y 20 unidades de transcriptasa inversa. Luego de incubar a 37°C por 45 min, se agrega EDTA hasta una concentración final de 20 mM. Se agrega después 0,5 ml de 0,25 N NaOH y se incuba a 65°C por una hora para hidrolizar el ARN templado. Después de neutralizada, la mezcla se extrae con el mismo volumen de fenol:cloroformo (1:1) y los productos de reacción se separan de los nucleótidos no incorporados por pasaje a través de una columna de Sephadex G-50 (vol = 7 ml) equilibrada en STE. Las fracciones excluidas se colectan y los ácidos nucleicos se precipitan con etanol. Este protocolo resulta en sondas radiactivas con una actividad específica de aproximadamente 5×10^9 cpm/ μg .

Purificación de plásmidos

Cepas de *E. coli* HB101 conteniendo plásmidos pertinentes [pUC19 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985), los plásmidos de expresión de la familia pTZ (D. Mead, University of Illinois), o los plásmidos recombinantes construídos durante estos estudios] se dejan crecer a saturación en 500 ml de medio 2xYT en presencia de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ampicilina. Las células se colectan por centrifugación a 7.000 rpm durante 10 minutos y luego de lavarlas en 0,1 vol de solución salina se resuspenden en 6 ml de 25% sacarosa en 50 mM Tris-HCl pH 8,0. Luego de incubar durante 10 min a 4°C, se agregan 2 ml de una solución fresca de 25 mg/ml lisozima en 0,25 M Tris-HCl pH 8,0 y 2 ml de 0,25 M NaEDTA pH 8,0. Luego de incubar a 4°C por 15 min, las células se

lisan con 8 ml de una solución que contiene 1 g% del detergente no iónico Brij 58 y 0,4 g% de desoxicolato de sodio. El lisado se decanta a 19.000 rpm durante 60 min. El ADN se purifica en gradientes de CsCl en la presencia de EtBr; 18 ml del lisado clarificado se mezclan con 20 g de CsCl recristalizado y 2 ml de 4 mg/ml EtBr. El gradiente se centrifuga a 45.000 rpm a 20°C durante 18 horas en un rotor vertical, o durante 40 horas en un rotor de ángulo fijo. La banda que contiene el ADN circular se colecta por punción lateral y se extrae varias veces con n-butanol, para eliminar el EtBr. Luego de diálisis extensa en TE, el ADN así purificado se extrae una vez con fenol:cloroformo 1:1 y se colecta por precipitación con etanol. Típicos rendimientos son del orden de 1,0 a 1,5 g de ADN purificado.

Preparación de células HB101 competentes para la transformación

Células de *E. coli* HB101 se dejan crecer a 37°C hasta una densidad óptica a 600 nm de 0,6. Luego de enfriar el cultivo sobre hielo, las células se centrifugan a 6.000 rpm durante 5 min y se lavan en mitad de su volumen de 50 mM CaCl₂. Luego de colectar las células por centrifugación, se resuspenden en 1/20 vol de 50 mM CaCl₂ / 15% glicerol. Luego de incubar a 0°C durante 30 min, se distribuyen en alícuotas y se congelan a -70°C. Células preparadas de esta manera producen del orden de 10⁶-10⁷ transformantes / μg de plásmido.

Transformación de *E. coli* HB101 con ADN de plásmidos

100 μ l de la suspensión de células competentes se incuban durante 30 min a 0°C con 10-50 ng de ADN de plásmido. Luego se calienta a 42°C durante 2 min y se enfría sobre hielo súbitamente. 1 ml de medio 2xYT se agrega a la suspensión y se incuba a 37°C durante 50 min para permitir expresión fenotípica. Las células se siembran en medio enriquecido conteniendo 100 μ g/ml ampicilina.

Preparación de células JM103 competentes para la transfección

Células de *E. coli* JM103 se dejan crecer a 37°C hasta una densidad óptica a 600 nm de 0,25. Luego de colectarlas por centrifugación, se lavan en 1/5 vol de buffer de transfección (100 ml contienen 4,5 ml 1 M MnCl₂ / 6 ml 1 M CaCl₂ / 4 ml KOAc pH 6,2 / 30 ml 50% sacarosa / 1,3 g RbCl). Las células se colectan nuevamente y se resuspenden en 1/25 vol del mismo buffer, y se mantienen a 0°C durante 30 min. Luego se agrega 9 μ l DMSO / 250 μ l de suspensión celular y se incuba durante 10 min más. Estas células se usan inmediatamente para la transfección con fago M13 (Messing, 1983). Si se guardan a -70°C, la eficiencia de transfección disminuye un orden de magnitud luego de una semana. Con este protocolo se obtienen 1.000-2.000 placas con 0,2 ng de forma replicativa.

Transfección de *E. coli* JM103 con la forma replicativa del fago M13

0,25 ml de la suspensión de células competentes se incuban con 1-5 ng de ADN y se incuban durante 40 min a 0°C, después de lo cual se lleva a 37°C durante 2 min. A esta suspensión se agregan 0,1 ml de un cultivo fresco de JM103, 60 µl de una mezcla X-Gal/IPTG (5 vol 2% X-Gal en dimetilformamida : 1 vol 100 mM IPTG) y 3 ml de agar blando a 45°C, y se siembra en cajas de Petri conteniendo 30 ml de agar enriquecido. Luego de 10-12 horas a 37°C, las placas son detectables, aunque el color aparece una hora más tarde.

Clonado de secuencias genómicas en pUC19

Aproximadamente 100 ng de ADN de *B. subtilis* cortado con las enzimas *Hind*III y *Eco*RI, fue ligado con 200 ng de ADN del plásmido pUC19 cortado con las mismas enzimas. El plásmido linearizado fue aislado del segmento interviniente en geles de agarosa (1% en buffer E); después de visualizar la banda correspondiente tiñendo con 2 µg/ml EtBr, ésta se electroeluye del gel contra un colchón de NH₄OAc (Saha *et al.*, 1983) y el ADN se concentra por precipitación con etanol; el ADN así purificado es usado en las reacciones de ligación. El objeto de aislar el vehículo linearizado del pequeño segmento interviniente es disminuir el número de moléculas circulares formadas durante la ligación que no contengan fragmentos pasajeros. Las ligaciones se llevan a cabo en un volumen de 25 µl, en 50 mM Tris-HCl pH 7,8 / 5 mM MgCl₂ / 10

mM β -mercaptoetanol, usando la enzima ADN ligasa del fago T4. El ADN recombinante se utiliza para transformar células competentes (*E. coli* HB101), y los recombinantes se siembran en cajas de Petri conteniendo 25-30 ml de agar BBA. Las colonias se transfieren a filtros de nitrocelulosa, y se hibridizan con la sonda radiactiva descripta.

Subclonado en plásmidos y bacteriófago M13

Los fragmentos de ADN que van a ser subclonados, se purifican en geles de agarosa o de poliacrilamida, de los cuales son electroeluidos contra un colchón de acetato de amonio. Las reacciones de ligación se llevan a cabo igual que anteriormente, pero usando sólo 100 ng del vector apropiado, y 10-15 ng del fragmento de interés. Los plásmidos recombinantes se usan para transformar *E. coli* HB101; los fagos recombinantes se usan para la transfección de *E. coli* JM103 (Messing, 1983). Cuando las ligaciones se llevan a cabo entre fragmentos romos, el medio de reacción contiene 50 mM Tris-HCl pH 7,6 / 10 mM MgCl₂ / 5% (peso/volumen) PEG 8.000 / 1 mM ATP / 1 mM DTT; en estos casos la relación molar vector:fragmento es 3:1. A partir de las colonias (o placas) obtenidas se hacen minipreparaciones de ADN (de plásmidos o M13) que son analizadas por electroforesis en geles de agarosa.

Formación de extremos romos en fragmentos de ADN con proyecciones 5'

Las reacciones se llevan a cabo en un volumen de 25 μ l. 1-2 pmol de extremos (aproximadamente 1 μ g de plásmido de 3 kilobases de tamaño) se

incuban durante 25 min a temperatura ambiente en 50 mM Tris-HCl pH 7,2 / 10 mM MgSO₄ / 0,1 mM DTT / 2,5 mM de cada uno de los desoxiribonucleótidos, con 6 unidades del fragmento Klenow de la ADN polimerasa. La reacción se interrumpe calentando a 70°C durante 5 min. El ADN puede usarse directamente para consiguientes ligaciones, sin necesidad de purificarlo.

Minipreparación de ADN de plásmidos

Colonias aisladas de cajas de Petri se crecen a saturación en 10 ml de caldo de cultivo LB con 100 µg/ml ampicilina. Las células, colectadas por centrifugación a 7.000 rpm durante 10 min a 4°C, se resuspenden en 250 µl de 25% sacarosa en 50 mM Tris-HCl pH 8,0; luego de agregar 150 µl de 10 mg/ml lisozima en 0,1 M NaEDTA pH 8,0, la suspensión se incuba durante 15 min a 0°C. Las células se lisan con 0,5 ml de una solución que contiene 2% Triton X-100 / 10 mM Tris-HCl pH 8,0 / 62,5 mM NaEDTA pH 8,0. El lisado se centrifuga durante 15 min en una microcentrífuga (Ependorf) y el precipitado gelatinoso se extrae con una pipeta pasteur. El sobrenadante se calienta a 65°C por 5 min para precipitar proteínas. Una vez decantado, se extrae 2 veces con 0,5 ml fenol y los ácidos nucleicos se precipitan con etanol. El precipitado se disuelve en 75 µl de TE y se pasa por una minicolumna (vol = 0,5 ml) de Sephadex G-50. Si bien este método resulta en preparaciones razonablemente puras de ADN de plásmido (juzgado por su perfil en minigeles de 1% agarosa), cuando la pureza es un factor crítico (como en el caso de querer usar el ADN para secuenciar) se digiere con 0,1 mg/ml

ARNasa A pancreática (Sigma) durante 1 hora a 37°C, y luego se extrae con fenol-cloroformo y se colecta por precipitación con etanol.

Minipreparación de lisados de M13

Placas aisladas se resuspenden en 1 ml 2xYT y se incuban con agitación durante 8 horas. Luego de enfriar los cultivos brevemente sobre hielo, las células se decantan por centrifugación en una microcentrífuga durante 5 min. Al sobrenadante se agrega 10 µl de 10% SDS.

Detección de colonias recombinantes en filtros de nitrocelulosa

Sobre las cajas de Petri, se colocan filtros secos de nitrocelulosa (tipo BA85, Schleicher & Schuell) y se dejan humectar durante 1 min sin perturbar. Luego los filtros se colocan durante 1 min sobre hojas de papel Whatman 3MM (el lado con ADN hacia arriba) humedecidas con 0,5 N NaOH / 1,5 M NaCl. Se transfieren después a papel 3MM humedecido con 1 M Tris-HCl pH 8,0 / 1,5 M NaCl y se dejan durante 5 min. Los filtros con las colonias así transferidas se lavan por inmersión en 6x SSC. Después de ser secados, los filtros se llevan a 65°C durante 2 horas.

Los filtros se incuban durante 2 horas a 42°C en buffer de pre-hibridización, que contiene 50% formamida / 5x SSC / 5x Denhardt / 50 mM fosfato de sodio pH 6,5 / 0,5% SDS / 100 µg/ml ARN_r de *B. subtilis* como carrier. Luego, los filtros se transfieren al buffer de hibridización que contiene 50% formamida / 5x SSC / 1x Denhardt / 20 mM fosfato de sodio pH

6,5 / 10% sulfato de dextran / 0,5% SDS / carrier ARN_r a 100 µg/ml y la sonda radiactiva (10⁵-10⁶ cpm). Las hibridaciones se mantienen a 42°C durante toda la noche. Los filtros se lavan 3 veces con 2x SSC / 0,2% SDS por 10 min a temperatura ambiente; 2 veces con 2x SSC / 0,2% SDS por 15 min a 68°C; una vez brevemente con 2x SSC a temperatura ambiente y una vez con 0,2x SSC por 10 min a temperatura ambiente. Luego de ser secados, se utilizan para impresionar una placa de rayos-X (Kodak X-Omat).

Preparación de templado de cadena simple de M13 para secuenciar

E. coli JM103 se crece en 15 ml de 2xYT hasta una densidad óptica de 0,05 a 600 nm. Se infecta con 10 µl de una suspensión de fago M13 (título = 10¹²-10¹³ pfu/ml) y se incuba a 37°C durante 7-9 horas. Las células se colectan por centrifugación a 10.000 rpm durante 15 min. 7,75 ml del sobrenadante se transfieren a otro tubo, con cuidado de no perturbar el precipitado. El fago se precipita por el agregado de 1,25 ml 4 M NaCl y 1 ml 40% PEG 6.000. Luego de 10 minutos a temperatura ambiente, el precipitado se colecta a 10.000 rpm durante 20 min. Luego de resuspender en 250 µl de STE, el fago se extrae con fenol, luego con fenol:cloroformo (1:1), y finalmente con cloroformo, antes de precipitar con etanol.

Geles de gradiente para determinar secuencia

Los geles se preparan en buffer NNB. Se preparan 2 soluciones de acrilamida (Kodak): solución inferior (2,5x NNB / 10% sacarosa / 8% acrilamida / 0,4% bis-acrilamida / 8 M urea) y superior (0,5x NNB / 8%

acrilamida / 0,4% bis-acrilamida /8 M urea). Las dimensiones del gel son 20 cm x 40 cm x 0,4 mm. Para preparar el gradiente (Biggin *et al.*, 1983), usando una pipeta automática de 25 ml, se succionan 7 ml de solución superior; luego, y tratando de no perturbar la interfase que se forma, se succionan 7 ml de la solución inferior; se dejan pasar 2 burbujas y se dispensa cuidadosamente entre las placas de vidrio para formar el gel, que se completa con solución superior. Se deja polimerizar por lo menos durante una hora antes de usar.

Secuenciación de ADN

La secuencia de ADN se determina por el método de terminación de cadena por didesoxiribonucleótidos (Sanger *et al.*, 1977). Los *primers* utilizados son los específicos para los vectores pUC y sus derivados, y que se consiguen comercialmente. También se hace uso de *primers* específicamente sintetizados y que son complementarios a regiones del ARN P. En los casos en que genes son clonados en vehículos de expresión que contienen el promotor del fago T7 (Tabor & Richardson, 1985), las secuencias de los fragmentos insertados son determinadas usando un *primer* especialmente sintetizado que es complementario a este promotor. Los templados son de cadena doble (en el caso de plásmidos) o de cadena simple (en el caso de los fagos M13). Las reacciones se hacen en buffer TMS. La concentración de desoxiribonucleótidos es 0,4 mM. Las concentraciones de didesoxianálogos son: ddATP 0,176 mM; ddGTP 0,68 mM; ddTTP 1 mM; y ddCTP 1 mM.

Típicamente, 5 µg de templado se incuban con 2,5-5,0 ng de *primer* a 95°C durante 2 min, y a continuación se enfría la reacción rápidamente sobre hielo.

A ésta se agrega 30 μCi [α - ^{35}S]dATP, 6 μl del buffer 10x TMS y 1.500 unidades del fragmento Klenow de la ADN polimerasa, en un volumen final de 60 μl . Alícuotas de 9 μl se distribuyen en tubos conteniendo 1 μl de cada una de las mezclas de nucleótidos (en concentraciones 10 veces mayores que las concentraciones finales descritas en el párrafo anterior) y se incuban a 37°C por 20 min. Luego, se efectúa una "persecución" de las cadenas no terminadas a formas de alto peso molecular con una mezcla de nucleótidos sin análogos, durante 15 min a la misma temperatura. Las reacciones se liofilizan al vacío y se resuspenden en 10 μl 95% formamida / 15 mM NaEDTA pH 8,0. Alícuotas (2-3 μl) de éstas se resuelven en geles de secuencia que se corren a 35 Watts. Los geles son fijados en 10% metanol / 10% ácido acético / 2% glicerol durante 1 hora, colocados sobre papel Whatman 3MM y secados al vacío a 80°C. Los geles así secados impresionan una película de rayos-X (Kodak X-Omat).

Síntesis *in vitro* de ARN P

Los vehículos de expresión utilizados para la producción *in vitro* de ARN P (o de fragmentos de esta molécula) pertenecen a la familia de plásmidos pT7 (D. Mead & B. Kemper, University of Illinois), que contienen el promotor del bacteriófago T7. El ADN se lineariza con una enzima de restricción que posea un sitio de reconocimiento adyacente al término 3' del fragmento inserto; este ADN linearizado se utiliza como templado para la síntesis de un ARN complementario, utilizando la enzima ARN polimerasa de T7 (Grodberg & Dunn, 1988), que comienza la transcripción específicamente en este promotor. Típicamente, 5 μg de templado linearizado se incuban en un

volumen de 100 μ l con todos los ribonucleótidos (en concentración de 1 mM), en medio que contiene 40 mM Tris-HCl pH 8,1 / 6 mM MgCl₂ / 2 mM espermidina / 5 mM DTT, y la ARN polimerasa del fago T7. Esta enzima es purificada en el laboratorio por la Dra. B. Pace, usando una cepa superproductora de *E. coli* que contiene el gen de esta enzima clonado. Luego de 2 horas de incubación a 37°C, la reacción se interrumpe con el agregado de SDS a 0,5% y NaEDTA pH 8,0 a 20 mM. Luego de extraer con el mismo volumen de fenol:cloroformo (1:1), el ARN se precipita con etanol. Los productos de reacción se resuelven por electroforesis en geles de 8% poliacrilamida / 8 M urea. El ARN se visualiza por fluoroscopia ultravioleta, se eluye pasivamente en TE y se colecta por precipitación con etanol. La eficiencia de esta reacción es considerable, y con las condiciones aquí descriptas es posible sintetizar aproximadamente 10-15 μ g de ARN / μ g de templado.

Síntesis *in vitro* de precursores de ARN_t

Los precursores utilizados en estos estudios son pre-ARN_t^{His}, pre-ARN_t^{Asp} y pre-ARN_t^{Leu}. El pre-ARN_t^{His} es sintetizado *in vitro* usando como templado el gen correspondiente de *B. subtilis* clonado adyacente al promotor del fago SP₆; el plásmido recombinante fue cedido por la Dra. Barbara Vold, Stanford Research Institute. El precursor generado en este caso contiene el dominio maduro del ARN_t más 15 nucleótidos extra al término 5' y 5 nucleótidos extra al término 3'.

El precursor del ARN_t^{Asp} utilizado para los estudios cinéticos descriptos en esta tesis contiene 23 extra nucleótidos al término 5' y 10 al 3'. El gen fue

aislado de un clon en pBR322 cedido por la Dr. B. Vold que contiene un grupo de 16 ARN_t de *B. subtilis* (Green & Vold, 1983); de este clon primario el gen correspondiente al ARN_t^{ASP} fue aislado como un fragmento *DraI-DraI*, y clonado en el sitio correspondiente a *SmaI* en el plásmido pTZ18U. Los detalles del proceso de clonado son los explicitados anteriormente. Es a partir de este clon que, mediante técnicas de ingeniería genética que se presentan en la sección Resultados, los pre-ARN_t^{ASP} que difieren en sus términos 3' han sido construídos.

El precursor del ARN_t^{Leu} contiene 30 extra nucleótidos al término 5'. El gen fue aislado de un clon en pBR322 que contiene el grupo de 21 ARN_t de *B. subtilis* (Green & Vold, 1983). Un fragmento *FokI-SspI* conteniendo el gen fue clonado en el plásmido pTZ18U. El fragmento fue hecho romo (ya que la enzima *FokI* deja una proyección 5') y clonado en el sitio correspondiente a *SmaI*. A partir de este clon, y con la técnica de mutación dirigida por oligonucleótidos, los pre-ARN_t^{Leu} que difieren en el término 3' han sido construídos.

Para la síntesis *in vitro* de precursores, la reacción de ARN polimerasa se lleva a cabo en la presencia de 100 μ Ci de [α -³²P]UTP (actividad específica > 3.000 Ci/mmol). En estas reacciones, la concentración de UTP frío es 0,1 mM. La posterior purificación de los sustratos es igual al caso de síntesis de ARN P. Este protocolo resulta en la síntesis de precursores con actividades específicas del orden de 2×10^8 cpm/nmol.

Mutagénesis dirigida por oligonucleótidos

El método usado es una modificación del método de Kunkel (Kunkel *et al.*, 1987). Es un procedimiento eficiente para introducir mutaciones en secuencias clonadas haciendo uso de un oligonucleótido sintético complementario que presenta "mutaciones" en los sitios de interés. Este oligonucleótido se hibridiza con el templado de cadena simple, que se construye en la cepa de *E. coli* CJ236 (*dut⁻ ung⁻*). Esta cepa es deficiente en la enzima dUTPasa, que hidroliza dUTP y que permite la incorporación de un residuo de uracilo cada 100 pares de bases; normalmente, estos residuos son eliminados del ADN por la enzima uracil-N-glucosilasa (que falta en esta cepa). El templado, conteniendo uracilo, se hibridiza con el oligonucleótido mutagénico y la cadena complementaria se sintetiza con la ADN polimerasa del fago T₄. Luego de cerrar el círculo con ADN ligasa, el ADN se usa para transformar una cepa de *E. coli* *dut⁺ ung⁺*. El templado es degradado selectivamente, de tal manera que se incrementa (típicamente en un 80%) la progenie resultante de la cadena que no es templado, y que contiene la(s) mutación(es) de interés. Los mutantes se identifican directamente por secuenciación del ADN.

Las secuencias a mutagenizar se encuentran clonadas en vectores de la familia pTZ (D. Mead, University of Illinois) que contienen el origen de replicación del fago filamentoso de cadena simple f1. Cuando esta cepa se infecta con el fago ayudante M13K07 (D. Mead, university of Illinois) se generan círculos de cadena simple. 50 ml de un cultivo de *E. coli* CJ236 a OD₆₀₀ = 0,05 se infectan con 200 µl de una suspensión del fago ayudante (título = 6×10^{11} pfu/ml). Luego de 30 min a 37 °C, se agrega 70 µl de 50 mg/ml kanamicina y se continúa la agitación por 12 horas. Las células se

decantan a 17.000 rpm durante 15 min. Al sobrenadante se agrega 1/4 vol de 3,5 M NH₄OAc / 20% PEG 8.000, y se deja a 0°C durante 30 min. El ADN de cadena simple se colecta por centrifugación a 17.000 rpm durante 15 min, se resuspende en 200 µl de TE, se extrae varias veces con fenol-cloroformo (1:1) y se colecta por precipitación con etanol.

El oligonucleótido mutagénico es fosforilado antes de usar. Típicamente, 5 µg del oligómero se incuban con 10 unidades de polinucleotidil kinasa (Pharmacia) en presencia de 1 mM ATP, en un buffer que contiene 50 mM Tris-HCl pH 7,6 / 10 mM MgCl₂ / 5 mM DTT; luego de incubar durante por lo menos 1 hora a 37°C, el oligómero se purifica en una minicolumna Bond-Elut C8, semejante a las usadas en la última etapa de purificación de oligonucleótidos sintéticos.

Para la mutagénesis *in vitro*, 1 µg de templado de cadena simple (conteniendo residuos de uracilo) se hibridizan con 1 µg del oligómero fosforilado a 80°C durante 2 min en la presencia de 50 mM Tris-HCl pH 7,2 / 10 mM MgSO₄ / 0,1 mM DTT, en un volumen de 12,5 µl. Luego de dejar enfriar a temperatura ambiente, se agrega 5 µl de una solución que contiene 0,5 mM de todos los desoxiribonucleótidos; 2,5 µl 10 mM ATP, 3 µl H₂O, 40 unidades ADN polimerasa de T₄ y 4 unidades de ADN ligasa de T₄. La mezcla de reacción se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente y se usa directamente para transformar células competentes de *E. coli* HB101. Las colonias que aparecen en cajas de Petri que contienen 100 µg/ml ampicilina se recogen, de ellas se prepara ADN (por la técnica de minipreparación de plásmidos) y este ADN se secuencian para determinar cuáles son las colonias mutantes. En los casos presentados en esta tesis, 75% de las colonias transformantes resultaron mutantes.

Ensayo enzimático de la ARNasa P (holoenzima)

La holoenzima es reconstituída incubando durante 5 min a 37°C ARN P sintetizado *in vitro* con cantidades saturantes de la proteína P purificada de células. La cantidad de holoenzima en la reacción es determinada por la cantidad de ARN P. La proteína P es muy difícil de cuantificar; ninguno de los métodos colorimétricos es suficientemente sensible en los rangos de concentraciones que se necesitan; por lo tanto, las concentraciones de holoenzima que se presentan en Resultados son las concentraciones de ARN P. Las reacciones se llevan a cabo en volúmenes de 10-20 μ l y contienen 50 mM Tris-HCl pH 8,0 / 100 mM NH₄Cl / 15 mM MgCl₂. La concentración de sustrato se especifica en cada caso. Las reacciones son interrumpidas agregando 3 vol etanol frío. Luego de precipitar los productos de reacción, éstos se resuelven en geles de poliacrilamida (8% acrilamida / 0,4% bis-acrilamida / 8 M urea). Los geles son fijados, secados y expuestos como detallado anteriormente. Las bandas correspondientes a sustrato y productos son localizadas y se alinean la autoradiografía y el gel seco. Así identificadas, las bandas se cortan del gel seco y la cantidad de radiactividad en cada una de ellas se determina en un contador de centelleo (Beckman LS100). La extensión de la reacción puede así ser cuantificada.

Ensayo enzimático del ARN catalítico

El ARN P sintetizado *in vitro* (en las cantidades especificadas en cada caso en la Sección Resultados) se incuba con sustrato (también especificado en cada

caso) a 37°C en la presencia de 50 mM Tris-HCl pH 8,0 / 800 mM NH₄Cl / 100 mM MgCl₂ / 0,05% NP40. En ciertos experimentos, las concentraciones de cationes varían, y si es éste el caso, se indican en Resultados. Los productos de reacción se resuelven igual que anteriormente.

RESULTADOS

Clonado y secuencia del gen para el ARN de la ARNasa P

Antes de iniciar los estudios que conforman esta tesis, se había demostrado que cuando el ADN de *B. subtilis* es cortado con la enzima de restricción *EcoRI*, corrido en gel de agarosa y transferido a papel de nitrocelulosa (Southern, 1975), dos fragmentos (de 4,5 y 2,0 kilobases) hibridizan con ARN P marcado. El fragmento de 4,5 kilobases fue clonado en Lambda Charon 4A (Gardiner, 1984). De este clon original, un fragmento *EcoRI-PstI* (de aproximadamente 600 nucleótidos) fue subclonado en M13. Este clon contiene el último tercio del gen para el componente ribonucleico de la ARNasa P, como fue posible deducir comparando su secuencia con la obtenida por medios enzimáticos para el ARN (Reich *et al.*, 1986). Todos los intentos de clonar el fragmento de 2 kilobases fueron infructuosos (Gardiner, 1984).

Al comienzo, fueron varios mis intentos de clonar el gen entero. Los vehículos que se emplearon fueron Lambda Charon 4A (Maniatis *et al.*, 1982), los plásmidos pUC19 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985) y pBR322 (Bolivar *et al.*, 1977) y el fago M13 (Messing, 1983). Se trataron cortes genómicos diferentes (*HindIII*, *EcoRI*, *AccI*, *SphI* y *BamHI*) por sí solos y en combinaciones. En todos los casos, el resultado era el mismo: siempre se obtenían recombinantes primarios que hibridizaban con ARN P marcado, pero luego de tratar de aislarlos, la señal se perdía (datos no presentados). Intentos paralelos de clonar el gen para el ARN P de *Bacillus stearothermophilus* (T.L. Marsh &

D.S. Waugh, resultados no publicados) corrieron la misma suerte. El análisis por mapeo de restricción de estos clones parece indicar que el gen (o las regiones genómicas adyacentes) sufre reordenamientos y deleciones durante el proceso de clonado (T.L. Marsh, resultados no publicados). La segunda dificultad era la presentada por la sonda radiactiva usada (ARN P aislado de células marcado en el extremo 3' con [5'-³²P]-pCp y ARN ligasa de T₄); las dificultades inherentes a este *probe* se explicitan en Materiales y Métodos.

Estrategia para clonar el gen del ARN P

Dadas las dificultades mencionadas, se trató de diseñar un método de clonado que no llevara a la deleción de secuencias; también se diseñó un método para la síntesis de un *probe* radiactivo específico que no sufriera de las desventajas del usado hasta entonces. Este *probe* es generado como un cADN a partir de ARN P aislado de células como templado, con la enzima transcriptasa inversa. La síntesis de este *probe* se detalla en Materiales y Métodos. La estrategia consistió en clonar la región 5' del gen (los dos tercios no representados en el fragmento Eco-Pst); luego de eliminar las secuencias a ambos términos en los dos vectores recombinantes, los fragmentos así modificados fueron aislados, ligados y subclonados en un único vector de expresión que entonces contiene el gen para el ARN P desprovisto de secuencias genómicas a ambos términos, y que es estable. A partir de este vector es posible sintetizar un ARN *in vitro* cuya secuencia difiere sólo mínimamente de la del ARN P *in vivo*, como se detallará más adelante.

Clonado del fragmento 5' del gen

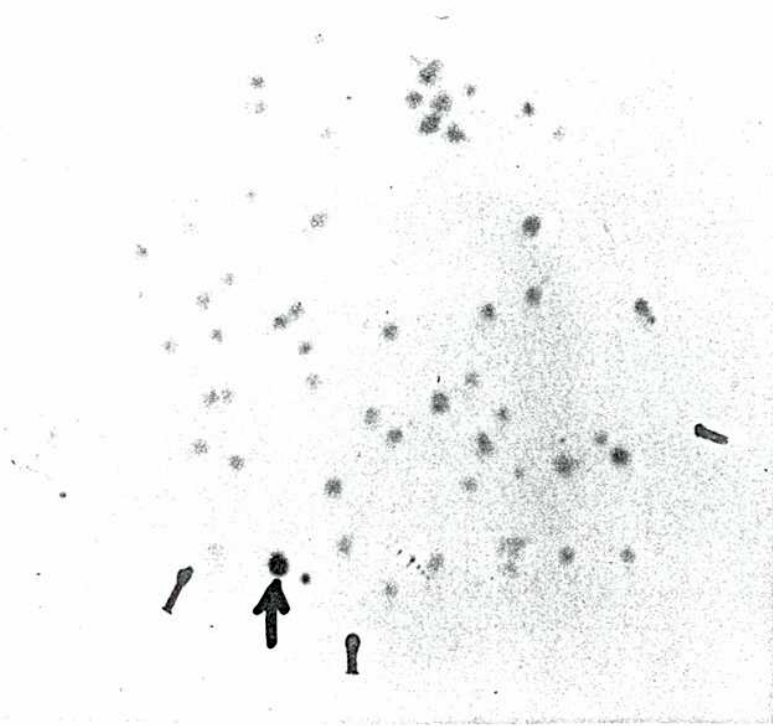
El vector utilizado fue pUC19 cortado con las enzimas *Hind*III y *Eco*RI; el vector linearizado fue aislado del segmento interviniente por electroforesis en

geles de agarosa al 1%. ADN de *B. subtilis* (preparado por T.L. Marsh) fue cortado con las mismas enzimas. Las ligaciones se efectuaron como se ha detallado en Materiales y Métodos. Luego de las ligaciones y previo a transformar células de *E. coli* HB101, el ADN fue cortado con la enzima *AccI*. El objeto es eliminar de la población aquellas moléculas recombinantes que contienen el fragmento 3' Eco-Hind del gen (que contiene un sitio *AccI*), de tal manera de clonar sólo el fragmento 5' Hind-Eco. Las colonias transformantes se transfieren a nitrocelulosa y los clones que contienen el fragmento con el gen de interés se detectan con el *probe* radiactivo. La Figura 1 muestra un ejemplo de la detección de clones recombinantes; la Figura 1A muestra una autoradiografía en la que se puede notar una colonia positiva para la hibridización (indicada con una flecha); la Figura 1B muestra dos clones que dieron señal positiva, luego de ser reaislados, sembrados en cajas de Petri, transferidos a nitrocelulosa e hibridizados nuevamente con el mismo *probe*.

Para determinar que ha sido el fragmento Hind-Eco el que ha sido clonado (y no el Eco-Hind), estos clones fueron secuenciados. El *primer* universal de secuenciación de M13 (Messing, 1983) fue utilizado para determinar la secuencia desde el sitio *EcoRI* y el complemento fue comparado con la secuencia del ARN P deducida por métodos enzimáticos y por transcriptasa inversa (la secuencia del ARN P aislado *in vivo* fue determinada por métodos enzimáticos por la Dra. B. Pace). La Figura 2 presenta un gel de secuencia representativo de los obtenidos por el método usado.

A partir de este clon, [pUC(HE)], el fragmento Hind-Eco fue aislado en geles nativos de 5% poliacrilamida y fue subclonado en M13mp8 y M13mp9. Para identificar los fagos recombinantes, minipreparaciones de lisados de placas obtenidas luego de la transfección (una gota) fueron colocadas sobre

A.



B.

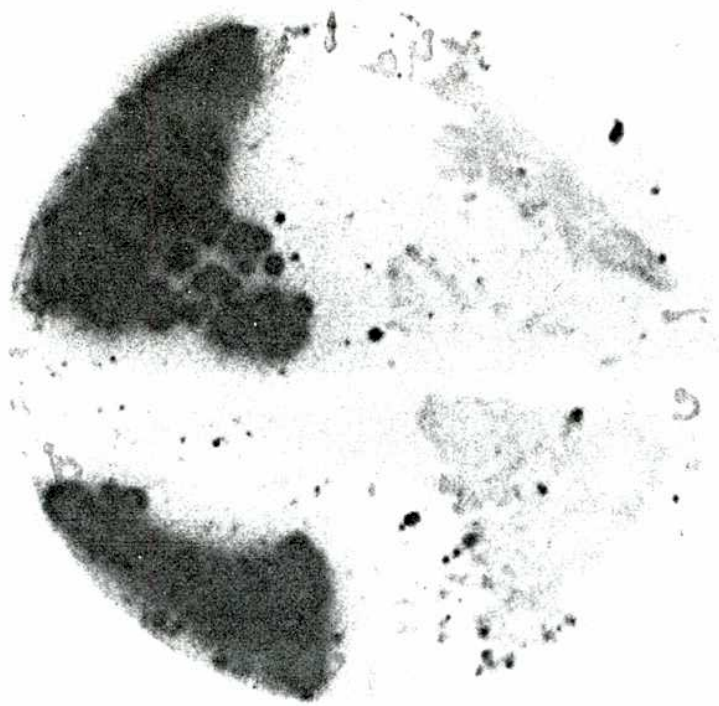


Figura 1. Detección de clones recombinantes.

1A: células de *E. coli* HB101 fueron transformadas con ADN del plásmido pUC19 ligado con fragmentos Hind-Eco de ADN de *B. subtilis*. Las colonias fueron transferidas a filtros de nitrocelulosa y éstos fueron hibridizados con cADN sintetizado usando como template ARN P de *B. subtilis* aislado de células. 1B: dos de los clones positivos, reaislados y sembrados nuevamente, luego de ser transferidos a nitrocelulosa e hibridizados.



Figura 2. Secuenciación de ADN.

La secuencia fue determinada por el método de Sanger. En este caso, el templado es bacteriófago M13mp8 conteniendo el fragmento 5' del gen para el ARN P.

nitrocelulosa e hibridizadas con el *probe*. De los fagos recombinantes así identificados se preparó templado para secuenciar el fragmento.

Para completar la secuencia también se hizo uso de un oligonucleótido sintético (de 18 nucleótidos) complementario al ARN P en las posiciones 143-161. La Figura 3 muestra un esquema de la región Hind-Pst (de casi 1.000 nucleótidos) que contiene el gen para el ARN P; en ella se indican los sitios de restricción importantes para las estrategias de clonado y la extensión de las secuencias determinadas usando distintos sustratos y distintos *primers*.

La secuencia completa del gen y las regiones adyacentes se presenta en la Figura 4. Los extremos del ARN fueron determinados por la Dra. B. Pace (Reich *et al.*, 1986). La identificación del término 5' fue consistente entre datos obtenidos por secuenciación directa del ARN y por transcripción inversa. El término 3' es heterogéneo; marcando con [5'-³²P]-pCp y ARN ligasa se obtienen dos poblaciones de moléculas que difieren en el largo por un nucleótido. Se estima que aproximadamente 50% de las moléculas terminan en la posición U₄₀₀, mientras que la otra mitad termina en U₄₀₁ (Reich *et al.*, 1986). En la Figura 4 se indican también ciertos elementos de la secuencia que serán discutidos luego.

Remoción de secuencias genómicas adyacentes al término 5' del gen del ARN P

A partir del plásmido recombinante pUC(HE), y haciendo uso de oligonucleótidos sintéticos, fue posible generar un clon del cual fueron eliminadas secuencias adyacentes al término 5' del gen para el ARN P. La estrategia consistió en reemplazar el fragmento *HindIII-PstI* de aproximadamente 100 nucleótidos con un fragmento sintético que vuelva a

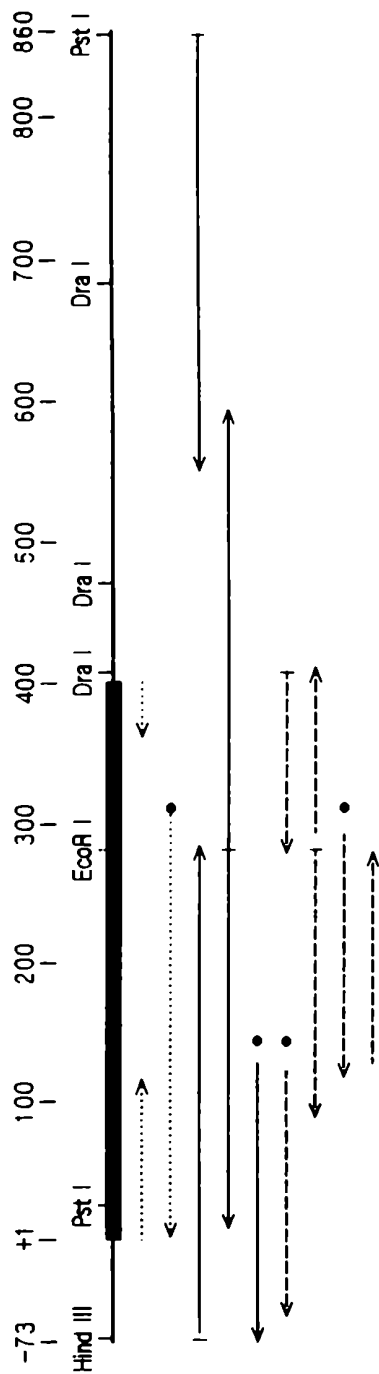


Figura 3. Mapa parcial de restricción del gen para el ARN P de *B. subtilis*.

La línea gruesa indica el ARN maduro. Las flechas indican la dirección y extensión de las secuencias determinadas: las flechas continuas indican secuencias de cadena simple (fago M13); flechas discontinuas indican secuencias de doble cadena (plásmidos); líneas de puntos indican secuencias de ARN P. Los primers utilizados fueron específicos de los vectores (rayas verticales) o complementarios al ARN P (puntos).

agregar sólo los 23 nucleótidos de la secuencia del ARN eliminados. Las posiciones #2 y #5 fueron alteradas tal que un sitio *Bam*HI fue generado al término 5' del gen (este sitio será de utilidad para clonar el gen entero en un vehículo de expresión, como se detalla más adelante); también fue agregado un sitio *Hind*III. El fragmento sintético (que posee extremos compatibles con *Hind*III y *Pst*I) fue clonado en el plásmido pUC(HE) del cual se ha eliminado el dicho fragmento Hind-Pst de 100 nucleótidos. De esta manera fue posible generar un clon que contiene los dos tercios del gen para el ARN P, esencialmente desprovisto de otras secuencias.

Los oligonucleótidos utilizados fueron de 33 y 25 residuos. La secuencia del oligómero-33 es: 5'-AGCTTGGATCCTAACGTTTCGGGTAATC-GCTGCA-3'. La secuencia del oligómero-25 es: 5'-GCGATTACCCGAA-CGTTAGGATCCA-3'. Estos oligómeros fueron hibridizados y el duplex así formado fue usado en ligaciones con el plásmido pUC(HE) cortado con *Hind*III y *Pst*I. Los clones recombinantes fueron detectados por análisis de restricción, ya que éstos contienen un sitio *Bam*HI que el clon parental no contiene. El clon fue confirmado por secuenciación.

Remoción de secuencias genómicas adyacentes al término 3' del gen del ARN P

Para eliminar las secuencias genómicas más allá del término 3' del gen del ARN P, el fragmento Eco-Pst de la forma replicativa del fago recombinante M13mp8 (K. Gardiner, 1984) fue aislado en geles de poliacrilamida. Este fragmento aislado fue digerido con la enzima *Dra*I. Los fragmentos así generados (Figura 3) fueron ligados a pUC18 cortado con *Eco*RI y *Sma*I; de los fragmentos presentes sólo el correcto Eco-Dra que contiene el tercio 3' del

gen puede ser ligado productivamente. Las colonias recombinantes fueron detectadas por análisis de restricción. El clon recombinante fue confirmado por secuenciación. El fragmento abreviado es escindido como un fragmento Eco-Hind para el siguiente paso.

Clonado del gen para el ARN P en un vehículo de expresión

Para generar un clon que contenga el gen entero para el ARN P en un vehículo de expresión adecuado, el fragmento Bam-Eco que contiene los dos tercios 5' del gen abreviado y el fragmento Eco-Hind que contiene el tercio 3' abreviado fueron aislados en geles de poliacrilamida y ligados en el vector pMT71 (O. Uhlenbeck, University of Colorado) cortado con *Bam*HI y *Hind*III, en una reacción que involucra tres fragmentos. Las colonias recombinantes fueron identificadas por análisis de restricción (Figura 5). En este caso se usó agarosa Nusieve (FMC Bioproducts) que ofrece buena resolución en el rango de 20-400 nucleótidos. El clon fue confirmado por secuenciación.

Los fragmentos 5' y 3' del gen fueron también clonados separadamente en vehículos de expresión. El fragmento 5' fue clonado como un segmento Hind-Eco, y el 3' como Eco-Hind en los plásmidos pT72 y pT71 (U.S. Biochemical Corp.). Las secuencias fueron confirmadas por secuenciación.

Los plásmidos de expresión descriptos fueron linearizados con las enzimas apropiadas y usados como templado para la síntesis *in vitro* de los ARN codificados. La secuencia de los ARN así producidos se presenta en la Figura 6. La Figura 7 presenta una fotografía del gel de poliacrilamida en el cual los ARN fueron aislados luego de la síntesis.

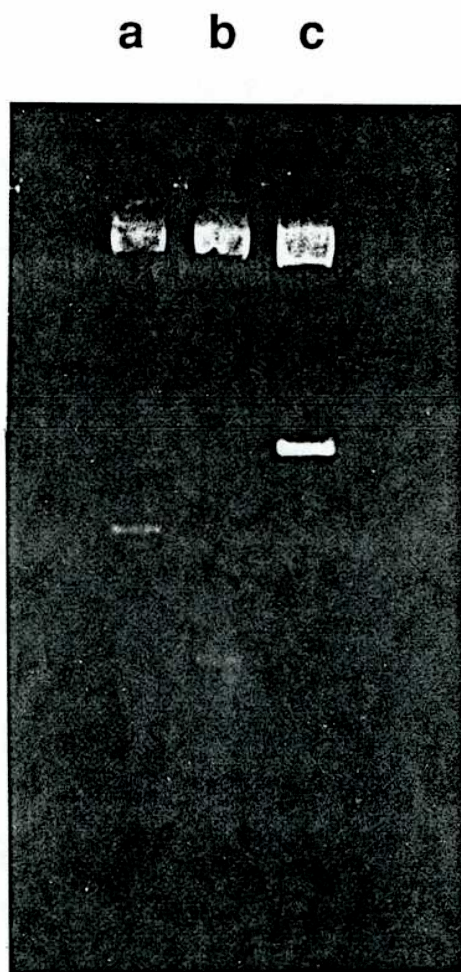


Figura 5. Análisis de restricción de clones recombinantes.

Los clones conteniendo (a) el fragmento 5' abreviado del gen para el ARN P, (b) 3' abreviado, y (c) ambos, fueron digeridos con las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI (a), *Eco*RI y *Hind*III (b) y *Bam*HI y *Hind*III (c). Los fragmentos fueron separados en geles de 4% agarosa NuSieve (FMC Bioproducts) en buffer E. Las bandas se visualizaron por teñido en 2 μ g/ml EtBr.

<i>in vivo</i>	GUUCCUA... (260 nt)...CCUUCUUUACGGAAUUA... (114 nt)...UU
completo (X)	GCGGAUCCUA... (260 nt)...CCUUCUUUACGGAAUUA... (114 nt)...UUACAUUUUGGGGAUCCUCUAG
completo (H)	GCGGAUCCUA... (260 nt)...CCUUCUUUACGGAAUUA... (114 nt)...UUACAUUUUGGGGAUCCUCUAGAGUCCGAGGCAUGCAAGCU
5' 70%	GCGAGACCGGAAGCUUGGAUCCUA... (260 nt)...CCUUCUUUACGGAAUU
3' 30% (X)	GGGAGACCGGAUUA... (114 nt)...
3' 30% (H)	GGGAGACCGGAUUA... (114 nt)...

Figura 6. Diferencias entre el ARN P *in vivo* y el sintetizado *in vitro*.

Se muestran las secuencias en los extremos y en la vecindad del sitio de restricción para *EcoRI*. *In vivo*: ARN P aislado de células. Completo (X) y (H): ARN sintetizados *in vitro* a partir del gen clonado y linearizado con las enzimas *XbaI* y *HindIII*, respectivamente. 5' 70%: fragmento 5' del ARN clonado hasta el sitio *EcoRI*. 3' 30% (X) y (H): fragmentos 3' del gen clonado desde el sitio *EcoRI* hasta los sitios *XbaI* y *HindIII*, respectivamente.

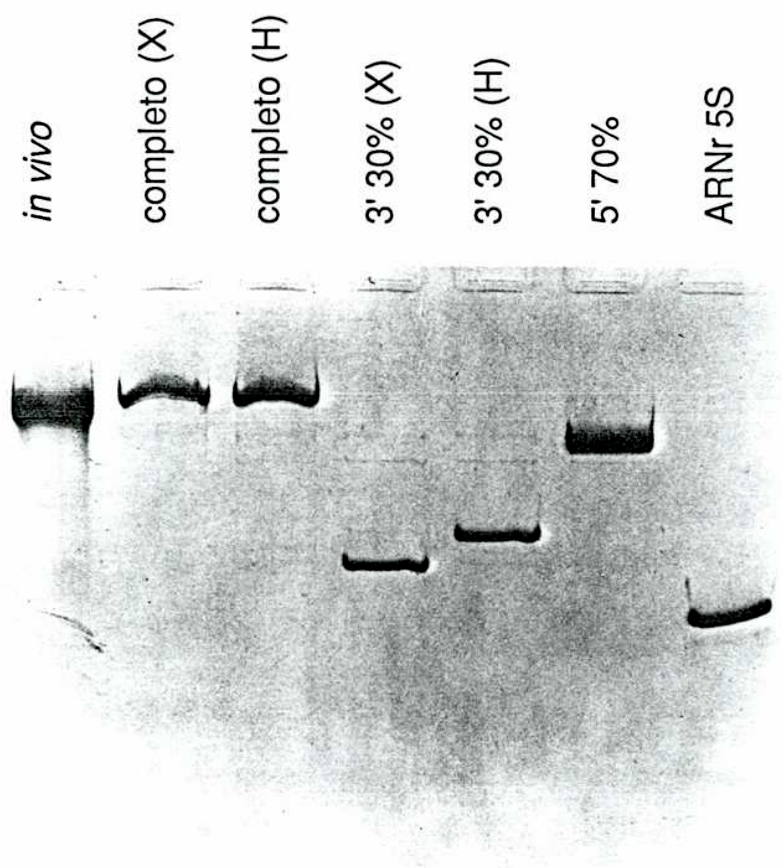


Figura 7. Análisis electroforético de los ARN sintetizados *in vitro*.

Los diferentes ARN fueron aislados en geles de 8% poliacrilamida / 8 M urea y fueron visualizados por teñido con 2 $\mu\text{g/ml}$ EtBr. Nombres de los distintos ARN es como en la Figura 6. ARN_r 5S fue aislado de células de *B. subtilis*.

La actividad enzimática sobre el sustrato pre-ARN_t^{His} de los ARN generados fue evaluada y los resultados de este experimentos se presentan en la Figura 8. Los ARN que contienen la secuencia completa del ARN P clivan el precursor generando los mismos productos que el ARN P aislado de células (usado como control). Los fragmentos 5' y 3' por sí solos son inactivos; sin embargo, mezclando cantidades equimoleculares de ambos es posible restaurar la actividad enzimática. Esto ocurre tanto si los fragmentos son hibridizados entre ellos por incubación a 70°C por 2 min antes de la reacción, o no. Controles en los cuales no se agrega ningún ARN catalítico (o fragmento) no muestran procesamiento del precursor. Cuando las reacciones se efectúan en presencia de ARN_r 5S de *B. subtilis*, en vez de ARN P, no es posible detectar clivaje del precursor (datos no presentados). Este experimento indica que el ARN generado por síntesis *in vitro*, y por ende carente de las modificaciones posttranscripcionales del ARN *in vivo*, es funcional. Además, el hecho de que es posible restaurar la actividad mezclando los dos segmentos indica que la continuidad en estructura primaria no es esencial; posiblemente es la estructura de orden superior (secundaria y terciaria) la que determina la actividad catalítica de la molécula.

Estos mismos ARN fueron evaluados en su capacidad de complementar la proteína P en el ensayo enzimático para la holoenzima. Los ARN fueron preincubados a baja fuerza iónica con proteína P (purificada por T.L. Marsh), o no, y su capacidad para clivar el sustrato pre-ARN_t^{His} fue evaluada. Como en el caso anterior, los ARN enteros (que comprenden la totalidad de las secuencias del ARN P maduro) son capaces de complementar la proteína P y generar una holoenzima activa en catálisis; los fragmentos aislados son incapaces de dicha complementación. Nuevamente, los fragmentos 5' y 3'

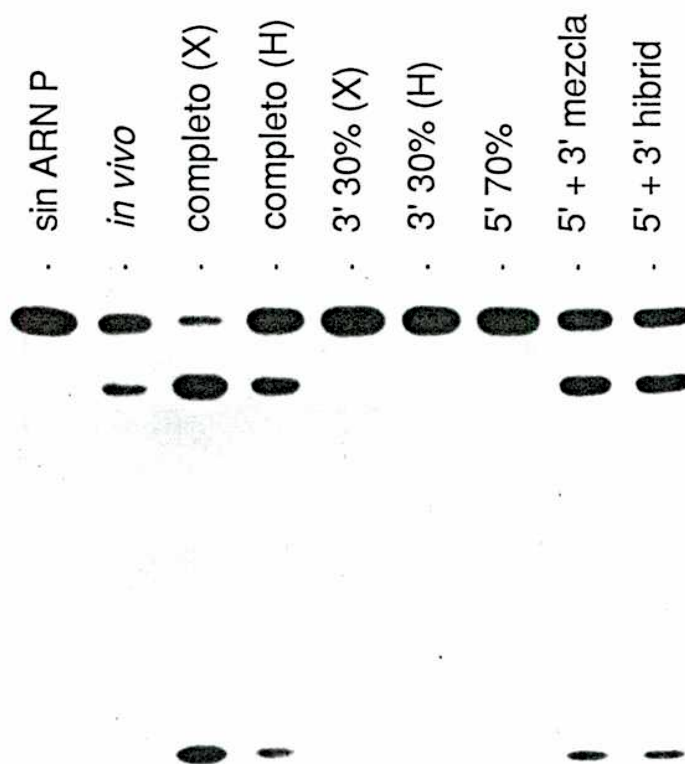


Figura 8. Actividad enzimática de los ARN sintetizados *in vitro*.

50 ng de ARN P (o cantidades equimoleculares de los fragmentos) fueron incubados durante una hora a 37°C con 30.000 cpm pre-ARN_t^{His} (actividad específica = 3×10^6 cpm/ μ g) en 50 mM Tris-HCl pH 8,0 / 0,6 M NH₄Cl / 250 mM MgCl₂ / 0,05% NP40. Los productos de la reacción se resolvieron en geles de 8% poliacrilamida / 8 M urea y fueron visualizados por autoradiografía. Nombres de los ARN es como en la Figura 6. En las reacciones que contienen ambos fragmentos, éstos fueron sólo mezclados (5'+3' mezcla) o mezclados y preincubados a 70°C durante 2 minutos y enfriados lentamente a temperatura ambiente, antes de iniciar la reacción (5'+3' hibrid).

mezclados en cantidades equimoleculares también son activos (datos no presentados).

Estudios enzimáticos de la ARNasa P (holoenzima) y del ARN P catalítico

In vivo y en condiciones fisiológicas *in vitro*, ambos componentes de la ARNasa P (proteína y ARN) son necesarios para efectuar catálisis; pero a altas concentraciones de cationes mono- y divalentes, el componente ribonucleico por sí solo es capaz de clivar específicamente precursores de ARN_t (Guerrier-Takada *et al.*, 1983). Como parte de esta tesis se trató de definir cada una de las reacciones (holoenzima y ARN P) en términos de sus parámetros cinéticos, con el objeto de elucidar cuál es el papel que juega la proteína o, en su ausencia, la alta concentración de cationes.

Para el estudio cinético de las reacciones se utilizó como precursor el pre-ARN_t^{Asp} de *B. subtilis*. Este precursor es sintetizado *in vitro* en la presencia de [α -³²P]-UTP; conociendo la cantidad de radiactividad en la reacción de síntesis, la molaridad de UTP frío, la cantidad de residuos de uridina en el precursor y su radiactividad una vez sintetizado, es posible determinar exactamente la actividad específica de este ARN y por lo tanto cuantificarlo en las reacciones de clivaje. El ARN P es cuantificado espectrofotométricamente. Luego de incubar enzima y sustrato en condiciones adecuadas, los productos de la reacción se separan por electroforesis en geles de poliacrilamida (como se explicita en Materiales y Métodos). La Figura 9 muestra un típico gel de ensayo enzimático; la banda superior corresponde al precursor, la intermedia al producto maduro y la inferior al segmento 5' específico del precursor. La

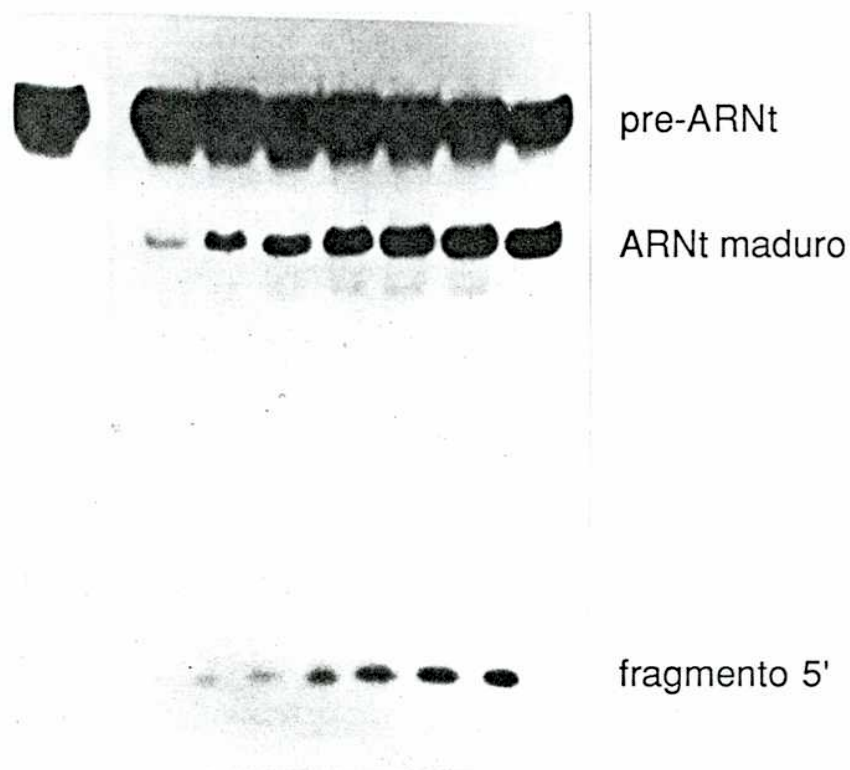


Figura 9. Ensayo enzimático de la ARNasa P.

La actividad es determinada incubando pre-ARN_t^{Asp} uniformemente marcado con ³²P, con ARN P solo o en presencia de cantidades saturantes de proteína P (holoenzima). ARN P y los ARN sustrato son sintetizados *in vitro* a partir de clones apropiados en vehículos de expresión que contienen el promotor del fago T7. Los productos de reacción se resuelven por electroforesis y se visualizan por autoradiografía. Esta figura muestra el curso de la reacción catalizada por ARN P que ha sido preincubado con ARN_t maduro; los tiempos son (de izquierda a derecha) 0, 1, 3, 5, 10, 15, 20 y 30 min. Estos resultados fueron graficados como "(E+I)+S" en la Figura 18A.

extensión de la reacción es cuantificada a partir de la radiactividad medida para cada una de las especies.

Optimización de la reacción catalizada por el ARN P

La Figura 10 muestra la extensión de la reacción catalizada por el ARN P en función de la cantidad de enzima presente. La concentración de sustrato es $2 \times 10^{-7} M$; la concentración de enzima ARN P varía entre 0,18 y $1,8 \times 10^{-9} M$ (1 y 10 ng de ARN P en un volumen de 20 μl). La extensión de la reacción es medida como la fracción de sustrato convertido a producto en 10 min a 37°C. Como es lo esperado de una enzima que actúa como un monómero a exceso de sustrato, la extensión de la reacción es directamente proporcional a la cantidad de enzima presente. En la figura se incluye un estudio semejante para el ARN de la enzima de *E. coli*; este ARN fue preparado por transcripción *in vitro* del gen correspondiente clonado en pT71 (D.S. Waugh). En este caso, la actividad es también función lineal de la cantidad de enzima presente.

La extensión de la reacción en función del tiempo de incubación a 37°C para distintas concentraciones de enzima se presenta en la Figura 11. La concentración de sustrato es $2 \times 10^{-7} M$. En el intervalo de 5 a 20 minutos, la reacción es directamente proporcional al tiempo de incubación. Sin embargo, las extrapolaciones a tiempo cero no pasan por el origen, y la discrepancia se acentúa a medida que la concentración de enzima aumenta. Esto parece indicar un carácter bifásico en la reacción: un primer componente rápido y luego un componente lineal. Este hecho será relevante para el diseño e interpretación de experimentos que se presentan y discuten más adelante.

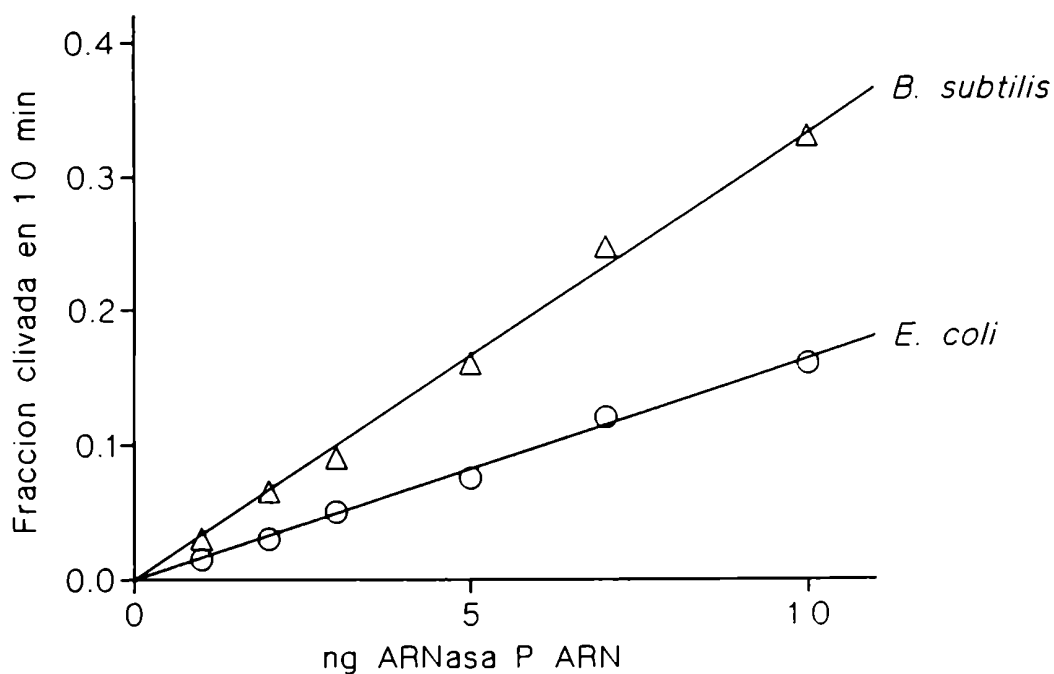


Figura 10. Extensión de la reacción en función de la concentración de ARN P.

La fracción de sustrato pre-ARN_t^{ASP} convertido a producto en 10 min por ARN P de *B. subtilis* y *E. coli* fue determinada para distintas concentraciones de ARN enzima (de 1 a 10 ng ARN P) en un volumen de reacción de 20 μ l. La concentración de sustrato es 2×10^{-7} M; las condiciones iónicas son 800 mM NH₄Cl / 100 mM MgCl₂.

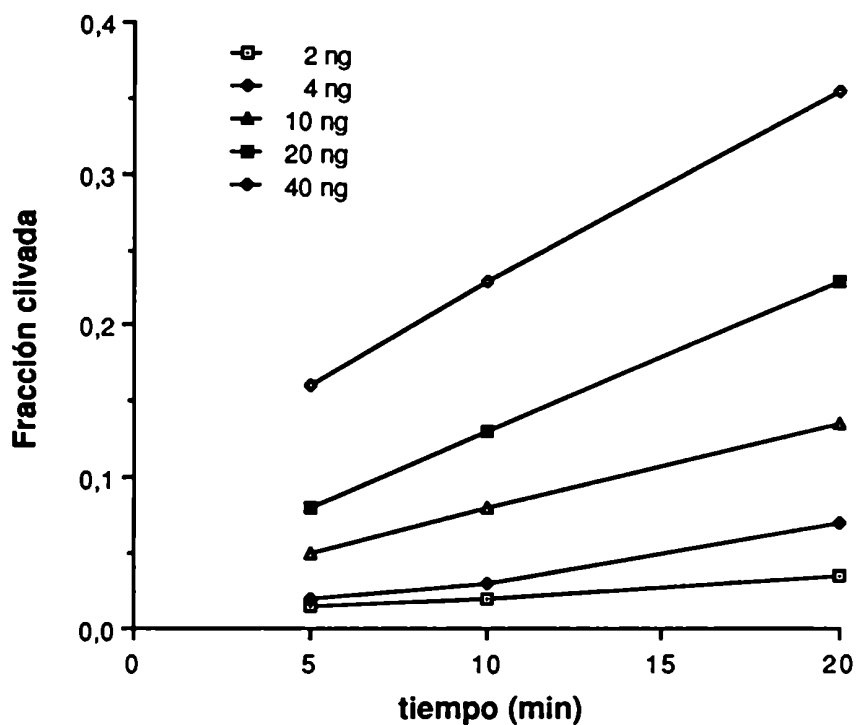


Figura 11. Curso de la reacción por ARN P.

Pre-ARN_t^{Asp} ($2 \times 10^{-7} M$) fue incubado con distintas cantidades de ARN P en un volumen de 20 μ l durante 5, 10 y 20 min. La fracción de sustrato convertido a producto fue determinada. Condiciones iónicas son como en la Figura 10. Las concentraciones de ARN P varían entre $0,375$ y $7,5 \times 10^{-9} M$.

Las concentraciones de cationes óptimas para la reacción fueron investigadas a continuación. La Figura 12A representa la extensión de la reacción luego de 15 min de incubación en función de la concentración de NH_4Cl , para dos distintas concentraciones de MgCl_2 , 20 y 200 mM. Las concentraciones de sustrato y enzima son 2×10^{-7} y $3,75 \times 10^{-9}$ M, respectivamente. A 20 mM MgCl_2 , la actividad presenta un óptimo a 800 mM NH_4Cl ; a 200 mM MgCl_2 la concentración óptima se alcanza a 400 mM y esencialmente no varía con su posterior incremento. Aparentemente, a altas concentraciones de Mg^{2+} el requerimiento de cationes monovalentes no es tan alto. Todas las reacciones catalíticas para el ARN P a partir de este momento se condujeron a 800 mM NH_4Cl , a menos que se especifique lo contrario.

A continuación se determinó la concentración óptima de MgCl_2 a 800 mM NH_4Cl (Figura 12B). Se observa un óptimo a 100 mM MgCl_2 . Las condiciones iónicas óptimas para el clivaje del precursor del $\text{ARN}_t^{\text{Asp}}$ por el ARN P así determinadas (es decir, 100 mM MgCl_2 / 800 mM NH_4Cl) resultaron diferentes a las halladas con el precursor semisintético usado anteriormente (Gardiner *et al.*, 1985); este precursor es sintetizado a partir de $\text{ARN}_t^{\text{fMet}}$ de *E. coli*, al cual se le agrega el tetranucleótido AAAC al término 5' con la enzima ARN ligasa del fago T4. Además, las condiciones iónicas óptimas para el procesamiento de precursores multiméricos en *B. subtilis* son también diferentes; aún los monómeros del precursor multimérico tienen óptimos iónicos diferentes (Vold & Green, 1988).

Optimización de la reacción catalizada por la holoenzima

La holoenzima para los ensayos enzimáticos es reconstituída *in vitro* a partir de ARN P y proteína P purificada de células. La extensión de la

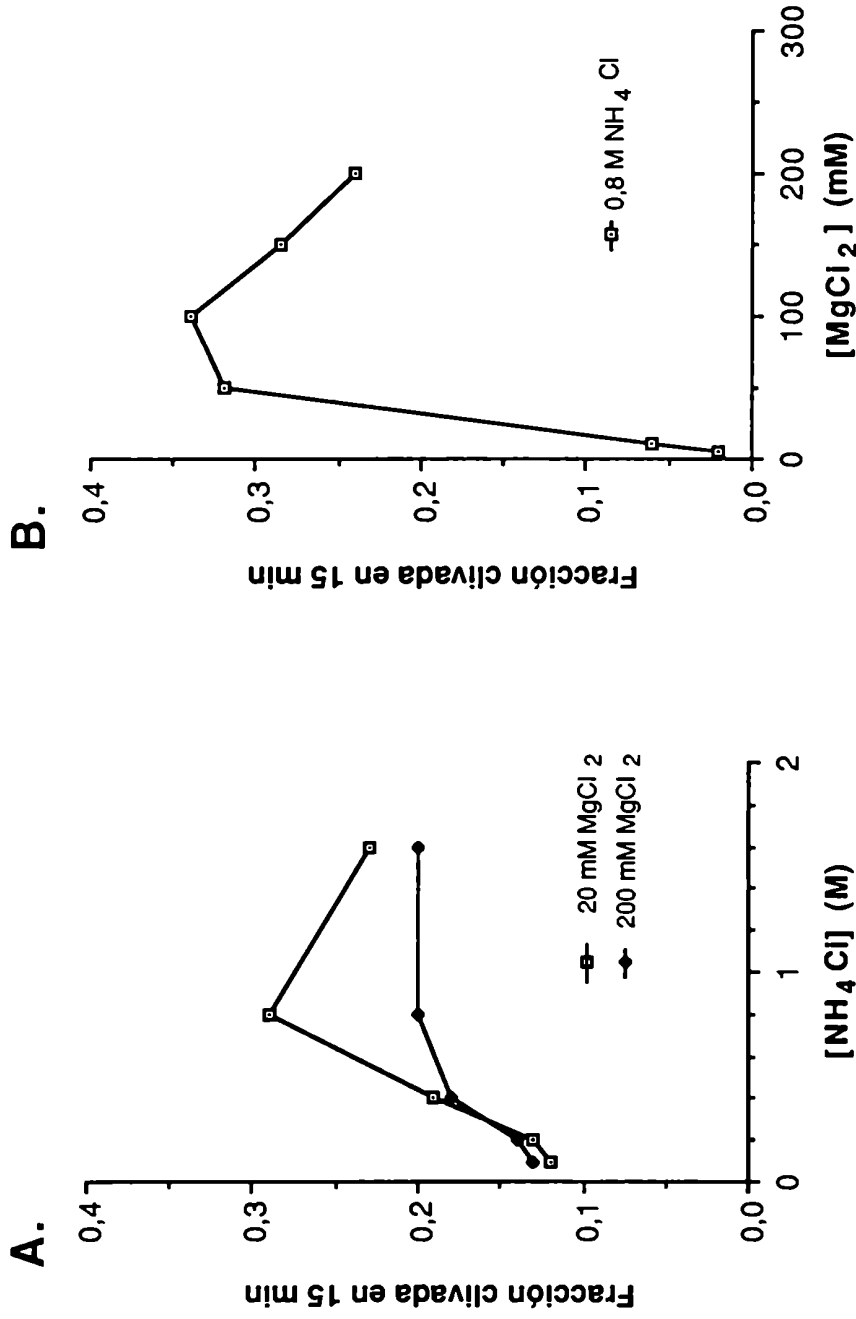


Figura 12. Determinación de las condiciones iónicas óptimas para la reacción catalizada por ARN P. Las concentraciones de pre-ARN_tAsp y ARN P fueron 2×10^{-7} M y $3,75 \times 10^{-7}$ M, respectivamente. Las reacciones fueron incubadas durante 15 min a 37°C en las condiciones iónicas indicadas. 12A: determinación del óptimo de NH₄Cl para 20 y 200 mM MgCl₂. 12B: determinación del óptimo de MgCl₂ para 800 mM NH₄Cl.

reacción catalizada por la holoenzima es directamente proporcional al tiempo de incubación a 37°C (Guerrier-Takada *et al.*, 1983) y no parece ser de carácter bifásico como en el caso del ARN P.

La Figura 13 muestra una autoradiografía para el ensayo enzimático de la holoenzima a distintas concentraciones de $MgCl_2$ (5, 15 y 30 mM). La concentración de sustrato pre-ARN_t^{Asp} es $2 \times 10^{-7} M$; la concentración de ARN P es $0,75 \times 10^{-9} M$ con distintas cantidades de un extracto de proteína P (T.L. Marsh) y la concentración de NH_4Cl es 100 mM. A bajas concentraciones de Mg^{2+} se observa clivaje no específico del precursor; esto es coherente con la potenciación de la acción de ribonucleasas no específicas (que cumplen funciones de "limpieza" *in vivo*) a bajas concentraciones de este cation (Pace, 1983). Al incrementar la concentración de Mg^{2+} el clivaje es específico (por la ARNasa P), observándose un óptimo a 15 mM.

La cuantificación de la proteína P en extractos purificados es muy problemática. Esta es una proteína moderadamente rara (su contenido celular está estimado en aproximadamente 50 moléculas/célula); el esquema de purificación es complicado y los rendimientos son generalmente bajos (B. Pace, comunicación personal). Los métodos no radiactivos de cuantificación de cantidades pequeñas de proteínas no son muy sensibles; uno de los usados más frecuentemente, el de teñido con Ag (Chuba & Palchadhuri, 1986), depende de la existencia de residuos de cisteína y la proteína P no contiene cisteína en su secuencia (Ogasawara *et al.*, 1985). Por esta razón, la cuantificación de la holoenzima es difícil. Para resolver este problema el ARN P se tituló con cantidades crecientes de extracto de proteína P purificada; de esta manera se estableció la cantidad de extracto necesaria para obtener máxima actividad con cantidades definidas de ARN P; las concentraciones de

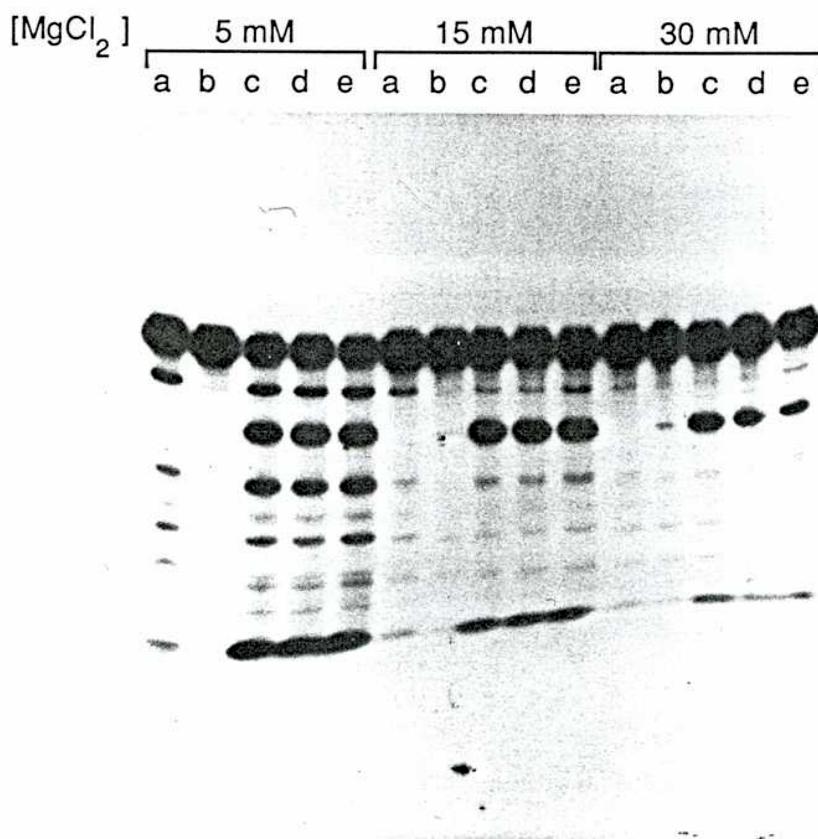


Figura 13. Actividad de la holoenzima a distintas concentraciones de $MgCl_2$.

30.000 cpm de sustrato pre-ARN^{His} (actividad específica = 3×10^6 cpm/ μ g) fueron incubados en un volumen de 20 μ l, a 37°C durante 30 min con 2 ng de ARN P saturado con extracto de proteína P (1, 2 y 3 μ l). La autoradiografía presenta los productos de reacción resueltos en un gel de 8 % poliacrilamida / 8 M urea. Las concentraciones de $MgCl_2$ se indican en la figura. (a) sustrato incubado en ausencia de enzima; (b) sustrato incubado con ARN P solo; (c, d, e) sustrato incubado con ARN P saturado con 1, 2 y 3 μ l de extracto de proteína P, respectivamente.

holoenzima son expresadas entonces como concentraciones de ARN P (titulado con cantidades saturantes de extracto de proteína P). La Figura 14 muestra tal titulación para una concentración de ARN P de $1,5 \times 10^{-9} M$; para esta cantidad de ARN P, la actividad máxima se alcanza con 0,1 μl de extracto. Para eliminar la posibilidad que el sustrato compite con el ARN P por la proteína, secuestrándola efectivamente del medio de reacción, una titulación semejante fue llevada a cabo con una concentración de sustrato 10 veces mayor; en estas condiciones se obtuvo la misma relación óptima ARN:proteína (datos no presentados).

Los parámetros cinéticos K_m y v_{max} de las reacciones catalizadas por la holoenzima y por el ARN P

La habilidad de altas concentraciones de cationes para sustituir la proteína en la reacción *in vitro* puede deberse a su influencia sobre el proceso catalítico *per se* o sobre la formación del complejo enzima-sustrato. Para evaluar cuál de estas posibilidades es la correcta, se investigó la influencia de la presencia de cationes (o proteína P) sobre los parámetros cinéticos K_m y v_{max} .

La Figura 15A muestra un gráfico Lineweaver-Burk de la reacción de procesamiento del pre-ARN_t^{ASP} catalizada por el ARN P en distintas condiciones iónicas. Para cada concentración de sustrato, se estimó la velocidad inicial (v_0) a partir de gráficos de extensión de la reacción en función del tiempo (datos no presentados). En esta figura es evidente que los cambios en la concentración de cationes mono- y divalentes influyen la formación del complejo enzima-sustrato (K_m disminuye con el agregado de cantidades crecientes de cationes); la velocidad de la reacción (v_{max}) esencialmente no varía. La presencia de cationes facilita la formación del

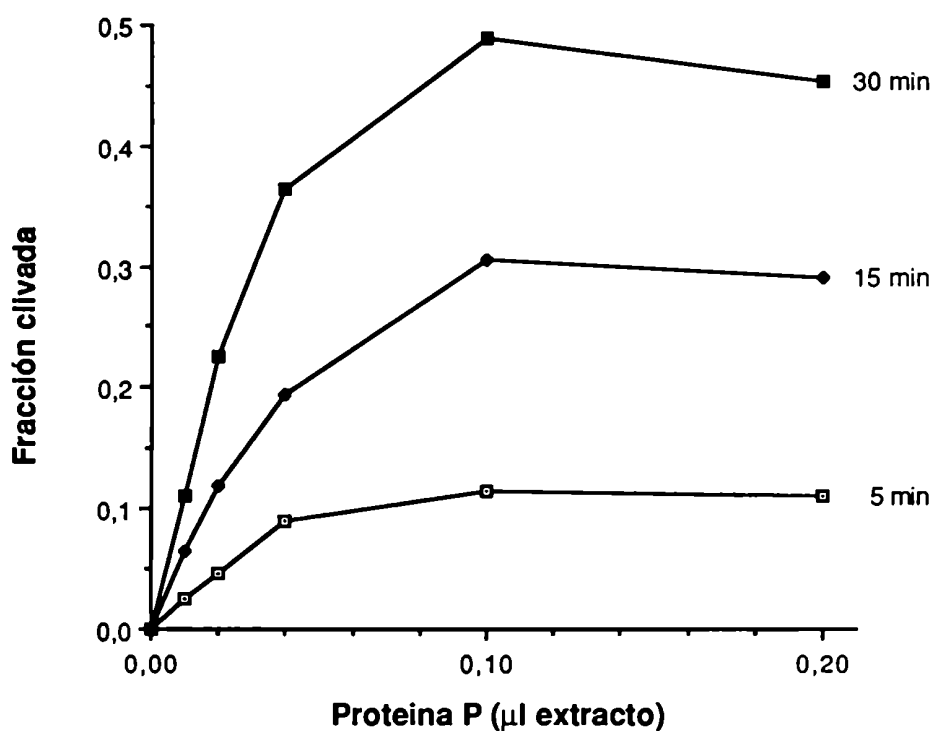
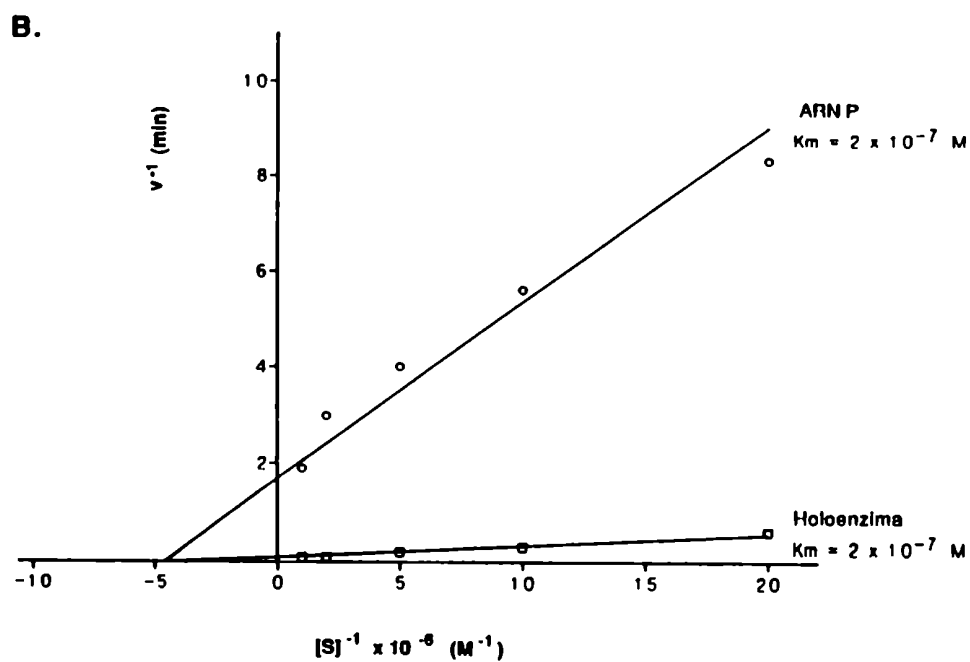
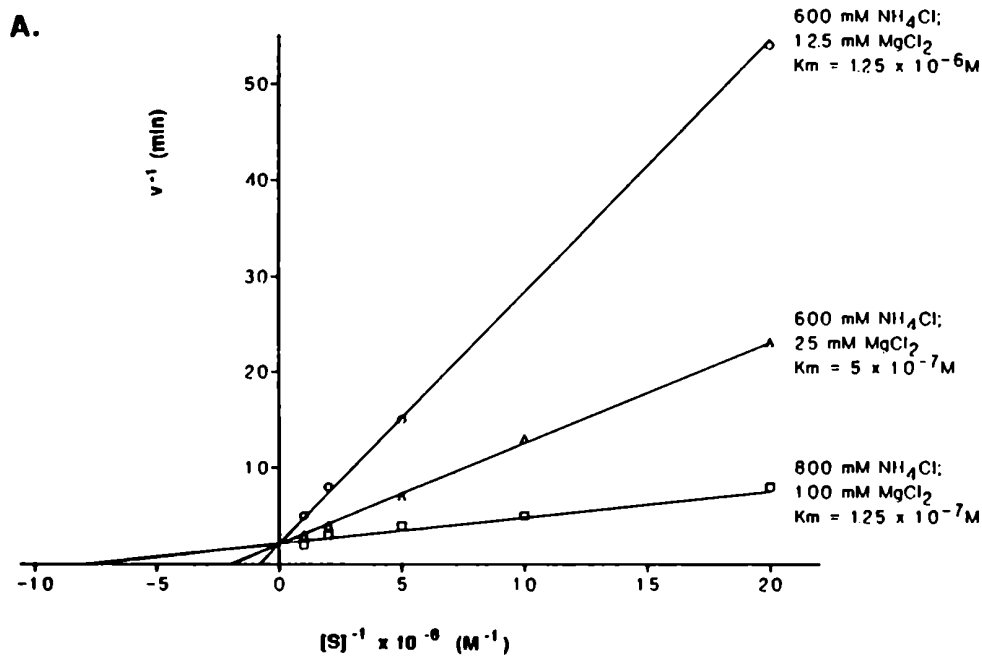


Figura 14. Titulación del ARN P con proteína P purificada.

2 ng ARN P fueron preincubados con distintas cantidades de un extracto de proteína P, en un volumen de 5 µl, a 37°C durante 5 min. Luego de agregar 5 µl pre-ARN_t^{ASP} (concentración final = $2 \times 10^{-7} M$), se incubó a 37°C por los tiempos indicados. La extensión de la reacción fue determinada.



complejo enzima-sustrato y no influencia el proceso catalítico *per se*; esto parece indicar que los cationes no promueven una transición conformacional de la enzima a una forma más activa a altas concentraciones de cationes. Estos datos son consistentes con la hipótesis que los cationes actúan contrarrestando la repulsión electrostática entre los dos ARN intervinientes en la reacción (Reich *et al.*, 1988). Es importante notar, sin embargo, que la reacción es muy lenta (sólo aproximadamente 1 mol de sustrato clivado por mol de ARN enzima por minuto). En distintos experimentos, el valor de K_m obtenido para las condiciones iónicas óptimas (100 mM $MgCl_2$ / 800 mM NH_4Cl) fue de aproximadamente 10^{-7} M.

La comparación de los parámetros cinéticos para las reacciones catalizadas por el ARN P y la holoenzima, ambas en condiciones iónicas óptimas, se presenta en la Figura 15B. Los datos fueron generados como en el caso anterior. Es evidente que los valores para K_m de ambas reacciones son similares. Esto parece indicar que en ambas reacciones la enzima es capaz de interactuar con el sustrato igualmente bien; la alta concentración de cationes y la presencia de la proteína P tienen la misma influencia sobre el ARN catalítico; este resultado indica que la proteína cumple una función esencialmente electrostática en la reacción. Sin embargo, el rol de la proteína va más allá de la simple titulación de cargas negativas, ya que posee también una influencia sobre la velocidad de la reacción que no es evidente en la acción del ARN P solo (v_{max} de la holoenzima es aproximadamente 20 veces mayor que la del ARN P a altas concentraciones de cationes).

Inhibición por producto

Como fue presentado en la sección Antecedentes, la enzima ARNasa P reconoce caracteres de las moléculas precursoras que pertenecen al dominio maduro de los ARN_t (Mazzara & McClain, 1980). Consistente con estos datos, la reacción tanto de la holoenzima como del ARN P son inhibidas competitivamente por ARN_t maduro.

La Figura 16 muestra un gráfico doble-recíproco de la reacción catalizada por el ARN P a distintas concentraciones de ARN_t maduro de *B. subtilis* (preparado por el Dr. D.S. Stahl). Los datos son generados como antes, a partir de gráficos de extensión de la reacción en función del tiempo para distintas concentraciones de sustrato y de inhibidor, a partir de los cuales se estima la velocidad inicial. Claramente, el ARN_t maduro inhibe la reacción competitivamente, como se evidencia por el incremento en K_m en presencia del inhibidor, y el hecho que v_{max} no es afectada. El hecho que $K_m \cong K_i$ implica que la enzima no discrimina entre precursor y molécula madura; esto indica que los elementos de reconocimiento residen en el dominio maduro de los ARN_t.

Este análisis efectuado en el caso de la reacción catalizada por la holoenzima arroja resultados similares. La Figura 17 muestra el gráfico doble-recíproco en este caso.

Curso temprano de la reacción

La acción de la proteína P sobre la velocidad de la reacción (ver Figura 15B) puede ser ejercida a distintos niveles. Por ejemplo, la proteína podría participar preveyendo grupos catalíticamente activos, o podría facilitar la

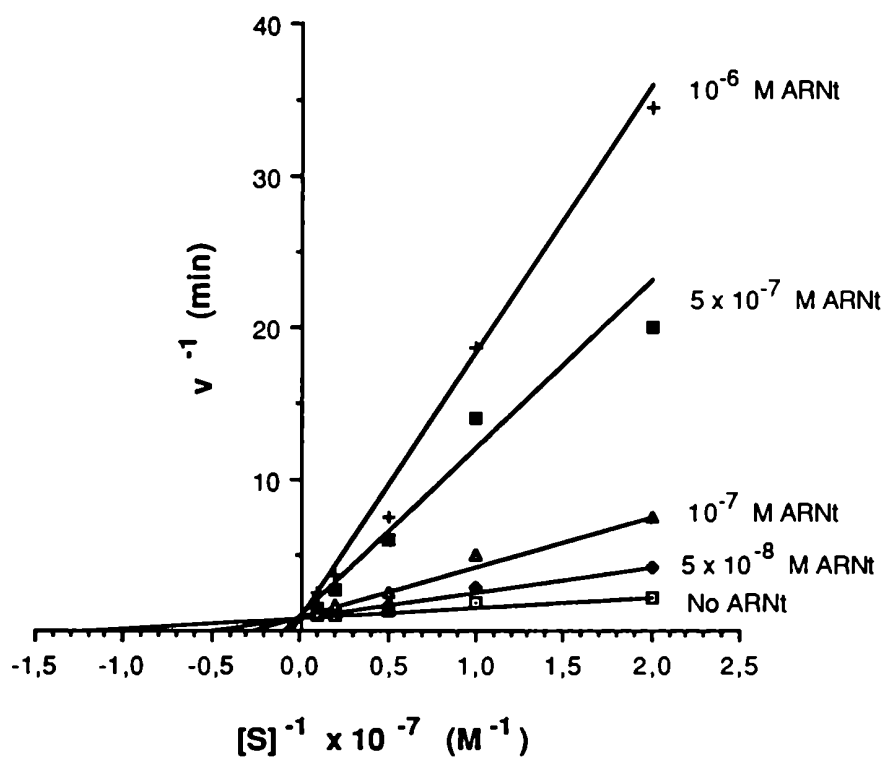


Figura 16. Inhibición por producto de la reacción catalizada por el ARN P.

Gráfico Lineweaver-Burk para distintas concentraciones de ARN_t maduro. La concentración de ARN P es $7,5 \times 10^{-9} \text{ M}$.

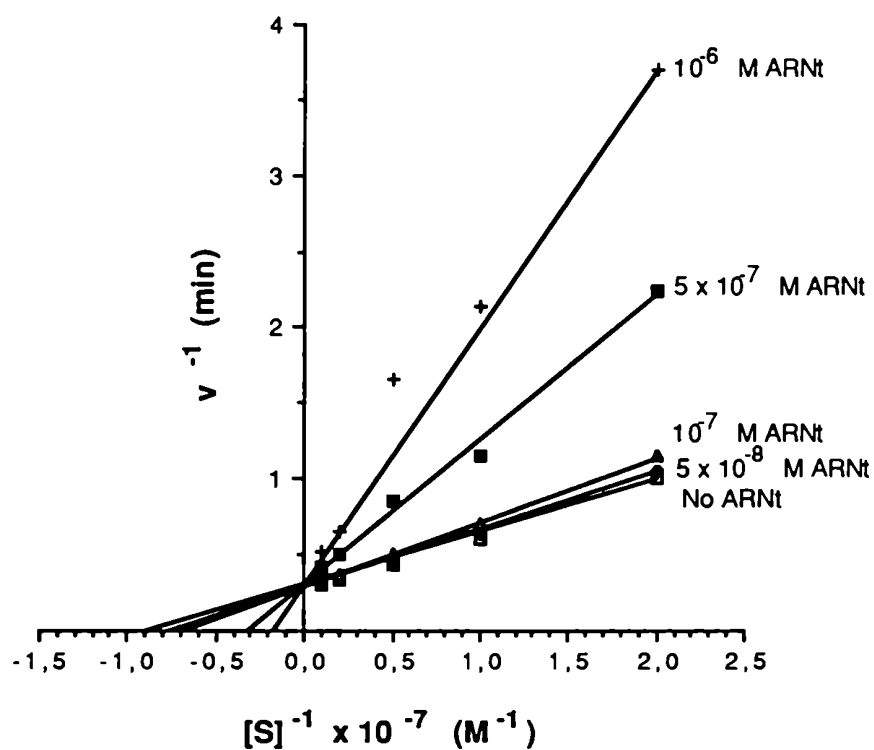


Figura 17. Inhibición por producto de la reacción catalizada por la holoenzima.

Gráfico Lineweaver-Burk para distintas concentraciones de ARN_t maduro. La concentración de holoenzima es $1,5 \times 10^{-9} \text{ M}$.

interacción entre ARN enzima y sustrato, o podría facilitar la disociación del producto clivado de la superficie de la enzima una vez efectuada la catálisis. Para tratar de decidir cuál de éstos es el caso, se estudió el curso temprano de la reacción catalizada por el ARN P solo y por la holoenzima en condiciones que permiten evaluar la extensión y características del primer ciclo de clivaje; esto se consigue si las reacciones se efectúan a concentraciones de sustrato:enzima de 2:1.

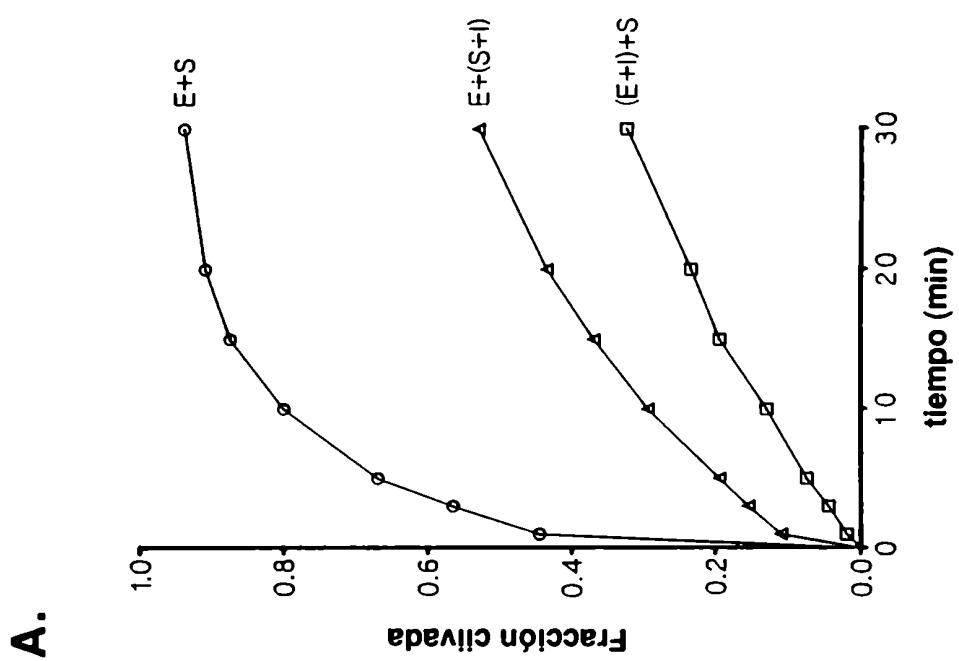
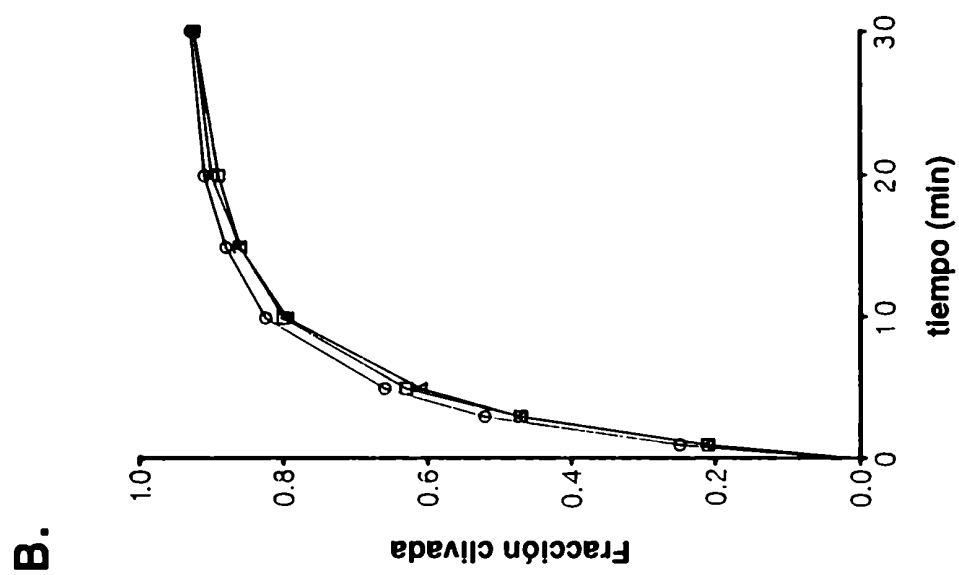
Cuando la reacción del ARN P solo a altas concentraciones de cationes se inicia mezclando ARN P y sustrato (pre-ARN_t^{Asp}), se observa un rápido primer *round* de clivaje (Figura 18A, curva E+S). Aproximadamente la mitad del sustrato es clivado durante este ciclo inicial; esta cantidad es estequiométrica con la cantidad de enzima presente. Este ciclo inicial se completa esencialmente a los 15 segundos de iniciada la reacción, y la cantidad de sustrato clivado es proporcional a la cantidad de enzima presente (Figura 19). La cantidad de sustrato clivado durante el primer minuto de reacción en el caso del ARN solo es mayor que la cantidad clivada por la misma cantidad de holoenzima en el mismo tiempo (Figura 18B, curva E+S). Este resultado indica que la acción de la proteína no ocurre en las etapas de formación del complejo enzima-sustrato ni en el clivaje del precursor *per se*.

Cuando la reacción del ARN P es iniciada con una mezcla de precursor y ARN_t maduro (Figura 18A, curva E+[S+I]), el clivaje inicial disminuye por un factor de 4, consistente con la dilución del precursor con inhibidor competitivo. Sin embargo, cuando la enzima se preincuba con inhibidor y la reacción se inicia con agregado de sustrato (Figura 18A, curva [E+I]+S), el clivaje inicial es drásticamente reducido. Este resultado indica que el ARN_t maduro no se disocia rápidamente de la superficie de la enzima, y de esta

Figura 18. Curso temprano de la reacción en la presencia o no de inhibidor competitivo (ARN_t maduro).

Pre-ARN_t^{Asp} (S), ARN_t maduro de *B. subtilis* (I), y ARN P o holoenzima (E) fueron preincubados en buffer de reacción durante 15 min a 37°C, solos o en las combinaciones que se muestran entre paréntesis. Las reacciones se iniciaron combinando enzima y sustrato (E+S), o enzima y sustrato más inhibidor (E+[S+I]), o enzima más inhibidor y sustrato ([E+I]+S).

Condiciones iónicas para la reacción por ARN P fueron 2 M NH₄Cl / 100 mM MgCl₂; para la holoenzima fueron 100 mM NH₄Cl / 15 mM MgCl₂. Las concentraciones finales fueron: [S] = 3 x 10⁻⁸ M; [E] = 1,5 x 10⁻⁸ M; y [I] = 10⁻⁷ M. A los tiempos indicados, alícuotas fueron precipitadas con etanol y los productos de reacción resueltos en geles de 8% poliacrilamida / 8 M urea. La extensión de la reacción fue determinada como la fracción de sustrato clivado. 18A: reacción por el ARN P. 18B: reacción por la holoenzima.



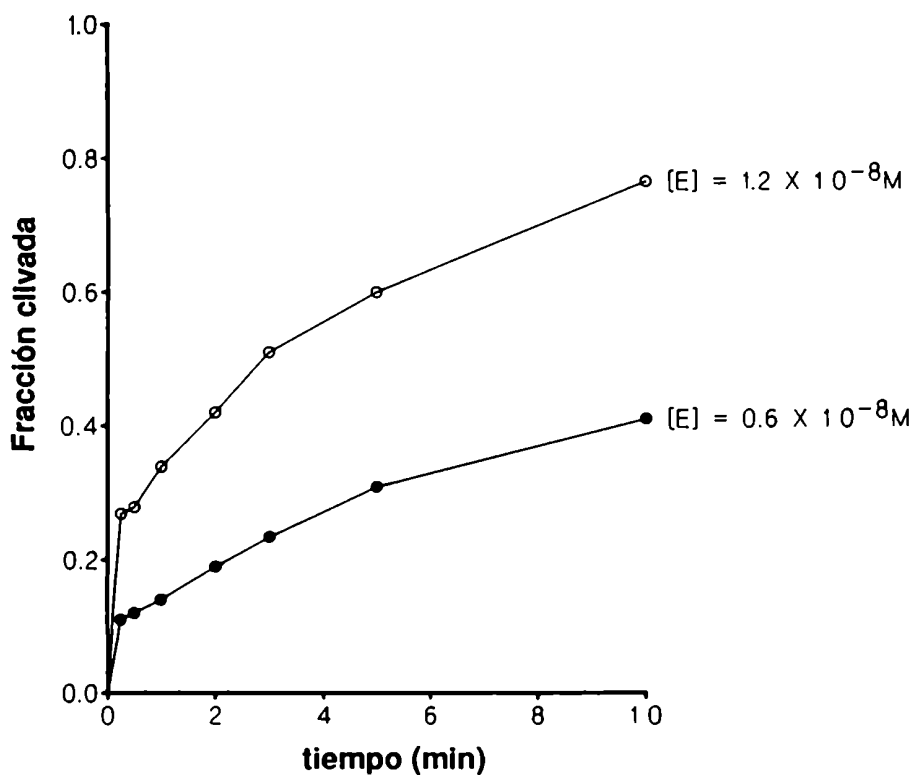


Figura 19. Curso temprano de la reacción por ARN P a diferentes concentraciones de ARN enzima.

Condiciones iónicas fueron $2 M NH_4Cl / 100 mM MgCl_2$. Concentración de sustrato pre-ARN_t^{ASP} fue $3 \times 10^{-8} M$. A los tiempos indicados, alícuotas fueron precipitadas con etanol y los productos de reacción fueron resueltos en geles de 8% poliacrilamida / $8 M$ urea. La extensión de la reacción fue determinada como la fracción de sustrato clivado.

manera el acceso del precursor está impedido. Contrariamente a lo expuesto, en la reacción catalizada por la holoenzima el ciclo inicial no es preferencialmente inhibido por producto y el orden de adición del inhibidor no tiene ninguna influencia sobre el curso temprano de la reacción; en la reacción de la holoenzima, la disociación del producto luego de la hidrólisis es rápida comparado con lo que ocurre en el caso del ARN P. Estos resultados sugieren un modelo para la acción de la proteína P que se presenta en la sección Discusión.

Influencia de la secuencia 3' CCA sobre el procesamiento del término 5'

La presencia de la secuencia CCA en el término 3' de los precursores de ARN_t de *E. coli* parece influenciar la eficiencia con que el término 5' es procesado (Guerrier-Takada *et al.*, 1984). En *B. subtilis*, 30% de los ARN_t no contienen CCA en su transcrito primario (Green & Vold, 1983). Es de particular interés determinar si la presencia o no de esta secuencia en los precursores afecta la maduración del término 5'. Con este fin, se comparó la eficiencia con que precursores, que contienen o no CCA en la secuencia del gen, son procesados en el término 5'. Los pre-ARN_t usados fueron pre-ARN_t^{Asp} (que contiene CCA) y pre-ARN_t^{Leu} (que no lo contiene y en el cual es agregado por la enzima nucleotidiltransferasa). A partir de éstos, y con técnicas de ingeniería genética, fueron generados precursores que difieren en sus términos 3'.

Modificación del término 3' del pre-ARN_t^{Asp}

El precursor utilizado en los estudios cinéticos descriptos hasta ahora fue el pre-ARN_t^{Asp}, que contiene 10 nucleótidos extra al término 3' (ver Materiales y Métodos para detalles). A partir de éste, se generaron clones que permitieron la síntesis de precursores terminando en el término maduro correcto CCA, que no lo presentan, o en los cuales la secuencia CCA ha sido reemplazada por GGA.

El clon original fue cortado con las enzimas *EcoRI* y *BamHI*, y el fragmento Eco-Bam conteniendo el gen para el precursor fue aislado en geles de 5% poliacrilamida. Este fragmento purificado fue cortado con la enzima *HinfI*, y el fragmento Eco-Hinf fue aislado también en geles de 5% poliacrilamida. Las secuencias terminales del gen fueron agregadas en forma de un fragmento sintético. Para ello, se sintetizaron dos oligonucleótidos complementarios con extremos compatibles con *HinfI* y *BamHI*, que contienen las secuencias terminales del gen e introducen un sitio *BstNI*. El fragmento Eco-Hinf (que contiene la porción 5' del gen) y el fragmento sintético (que contiene el fragmento 3' terminal del gen) fueron ligados en el vector pT71 (U.S. Biochemical) cortado con las enzimas *EcoRI* y *BamHI*, en una reacción que involucra tres fragmentos. El clon así generado, cuando se lineariza con la enzima *BstNI*, sirve como templado para la síntesis *in vitro* de un pre-ARN_t^{Asp} que termina en CCA.

Del mismo clon original, fue también generado uno que puede servir como templado para la síntesis de un ARN que no contiene CCA. El mismo fragmento Eco-Hinf fue aislado y las secuencias genómicas removidas fueron agregadas también en forma de un fragmento sintético. Dos oligonucleótidos

complementarios fueron sintetizados tal que los extremos son compatibles con *HinfI* y *BamHI*; este fragmento contiene las secuencias terminales del gen e introduce un sitio *NciI*. Nuevamente, el fragmento *Eco-Hinf* y el fragmento sintético fueron ligados en el vector pT71 cortado con *EcoRI* y *BamHI*. El clon así obtenido, cuando se lineariza con la enzima *NciI*, sirve como templado para la síntesis de un precursor que carece de CCA. A partir de este mismo clon, linearizado con la enzima *DpnI*, se puede sintetizar un precursor en el cual la secuencia terminal CCA ha sido reemplazada por GGA.

Los clones así generados fueron confirmados por secuenciación usando como *primer* un oligonucleótido sintético complementario a la región del promotor del fago T7. La Figura 20 muestra la secuencia de ambos clones en la región de interés con los sitios de restricción relevantes a las estrategias de construcción, clonado y expresión.

Clonado del pre-ARN_t^{Leu} y modificación del término 3'

El gen del ARN_t^{Leu} (que no contiene CCA en su transcrito primario) fue aislado a partir de un clon que contiene el multímero de 21 ARN_t de *B. subtilis* (Green & Vold, 1983). Este clon fue cortado con las enzimas *XmnI* y *SspI*; el fragmento de 439 pares de bases que contiene el gen para el ARN_t^{Leu} fue aislado en geles de 5% poliacrilamida. El fragmento así aislado fue cortado con la enzima *FokI*, que genera dos fragmentos, de 61 y 378 pares de bases, el último de los cuales contiene el gen de interés. Este fragmento fue purificado y tratado con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa en presencia de los desoxiribonucleótidos, para generar extremos romos. Este fragmento fue clonado en el vector pTZ18U (D. Mead, University of Illinois) cortado con la enzima *SmaI*. Los clones recombinantes fueron reconocidos

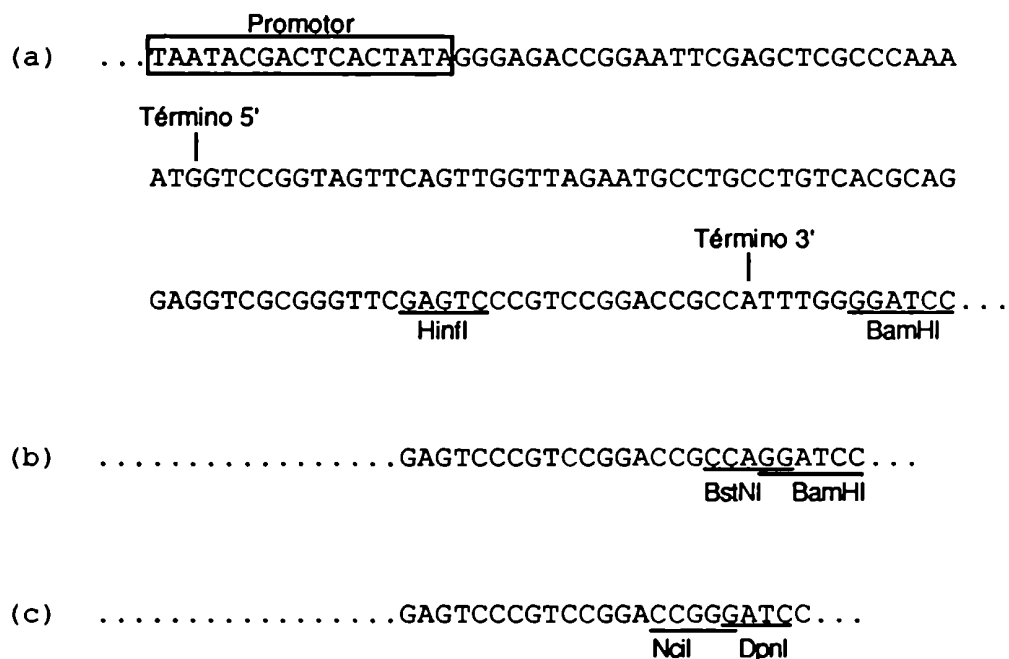


Figura 20. Secuencia de los clones en pT71 que contienen el gen para el ARN_t^{Asp} .

En la figura se indican el promotor del fago T7, los sitios de restricción relevantes a las estrategias de clonado y expresión, y los términos 5' y 3' del dominio maduro del ARN_t . (a) pre- ARN_t^{ASP} usado en los estudios cinéticos previos; (b) precursor AspCCA; y (c) precursor AspOH (y AspGGA).

por el ensayo colorimétrico para actividad de β -galactosidasa. Varios de los clones recombinantes fueron secuenciados para determinar aquellos con la orientación correcta. El clon así generado, cuando se lineariza con la enzima *MnII*, sirve como templado para la síntesis de un pre-ARN_t^{Leu} con un término UUA (en lugar del término CCA correcto cuando el precursor es procesado). A partir de este clon, con la técnica de mutagénesis dirigida por oligonucleótidos, fueron construídos clones que permiten la síntesis de precursores con la secuencia CCA, o sin ella, al término 3'.

Para generar estos clones, se utilizaron dos oligonucleótidos sintéticos que introducen mutaciones. En un caso se usó un oligómero de 21 residuos que presenta 3 discontinuidades que introducen un sitio *BstNI*; el clon así generado, cuando se lineariza con esta enzima, permite la síntesis de un precursor que termina en el CCA correcto. En el otro caso, el oligonucleótido usado contiene 20 residuos con 2 discontinuidades que introducen un sitio *Fnu4HI*; el clon así generado permite la síntesis de un precursor que carece de CCA. La metodología empleada se explicita en Materiales y Métodos. En ambos casos, los clones fueron confirmados por secuenciación. La Figura 21 muestra la secuencia terminal del gen para el ARN_t^{Leu}, y de los genes construídos a partir de éste para la síntesis de los distintos precursores.

Determinación de las condiciones iónicas óptimas para los distintos pre-ARN_t

Con el precedente que distintos sustratos pueden presentar óptimos diferentes en cuanto a las concentraciones de cationes se refiere (Reich *et al.*, 1986; Vold & Green, 1988), es importante determinar las condiciones iónicas favorables para la catálisis por ARN P de los diferentes pre-ARN_t^{Asp}.

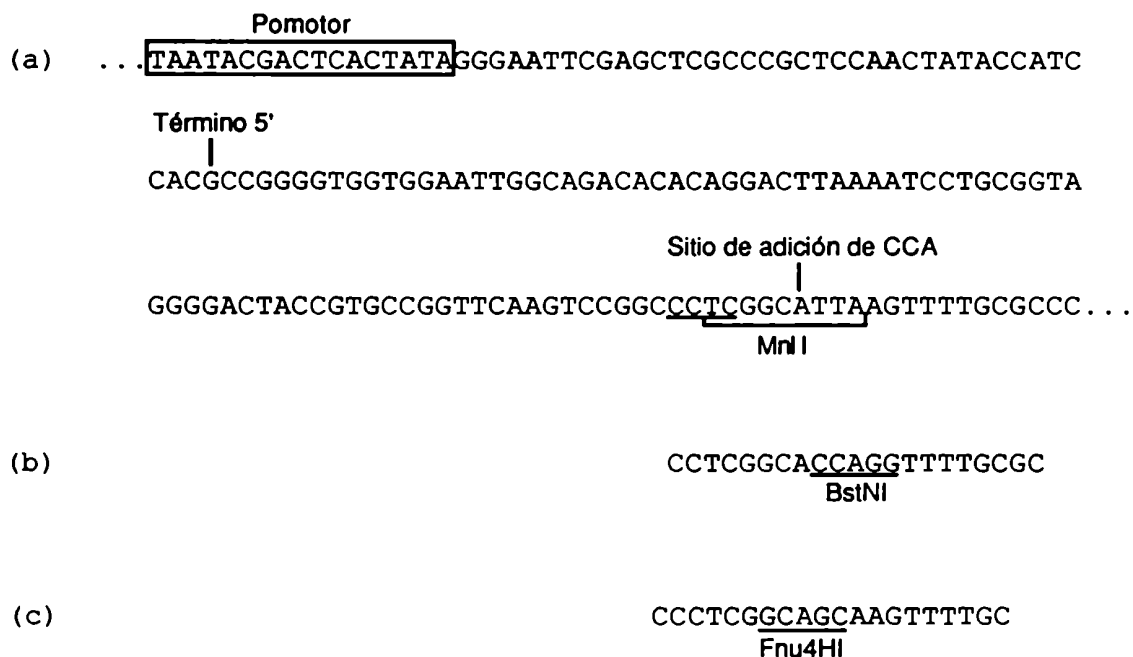


Figura 21. Secuencia de los clones en pTZ18U que contienen el gen para el ARN_t^{Leu}.

En la figura se indican el promotor del fago T₇, los sitios relevantes para la expresión y los términos 5' y 3' del dominio maduro del ARN_t. (a) precursor Leu_{UUA}; (b) secuencia del complemento del oligonucleótido mutagénico utilizado para generar el precursor Leu_{CCA}; y (c) secuencia del complemento del oligonucleótido mutagénico utilizado para generar el precursor Leu_{OH}.

Con este objeto, la extensión de la reacción por ARN P sobre estos sustratos en función de la concentración de NH_4Cl fue determinada para distintas concentraciones de MgCl_2 . Los resultados de tales titulaciones se presentan en la Figura 22A para $[\text{MgCl}_2] = 50 \text{ mM}$ y en la Figura 22B para $[\text{MgCl}_2] = 200 \text{ mM}$. Es evidente que los sustratos responden diferentemente a la concentración de cationes. El precursor-CCA requiere menores concentraciones de cationes para que la reacción alcance niveles óptimos. El precursor-OH y el precursor-GGA se comportan de manera semejante; ambos requieren más altas concentraciones de cationes para optimizar la reacción.

Los pre- $\text{ARN}_t^{\text{Leu}}$ también fueron objeto de un estudio semejante (datos no presentados). Como en el caso anterior, el precursor-CCA requiere menores concentraciones de cationes para alcanzar un óptimo, y los dos precursores restantes (-OH y -UUA) se comportan de manera semejante. Se evidencia nuevamente que las condiciones para observar reacción con el ARN P varían con diferentes sustratos.

A la luz de estos resultados, se investigó la previa contención de Altman y colaboradores (Guerrier-Takada *et al.*, 1984). En este trabajo, los autores concluyen que la reacción catalizada por el ARN solo requiere la presencia del extremo 3' CCA en el precursor; precursores que no la presentan son procesados por la holoenzima, pero no por el ARN P. La Figura 23 muestra la extensión de la reacción catalizada por el ARN de la ARNasa P de *E. coli* sobre los diferentes pre- $\text{ARN}_t^{\text{Leu}}$ en función de la concentración de cationes monovalentes (NH_4Cl) a diferentes concentraciones de MgCl_2 . Es evidente que en las condiciones iónicas en que Altman y colegas llevan a cabo los ensayos enzimáticos ($100 \text{ mM NH}_4\text{Cl} / 60 \text{ mM MgCl}_2$), la actividad sobre los precursores que carecen de CCA no es significativa; sin embargo, a

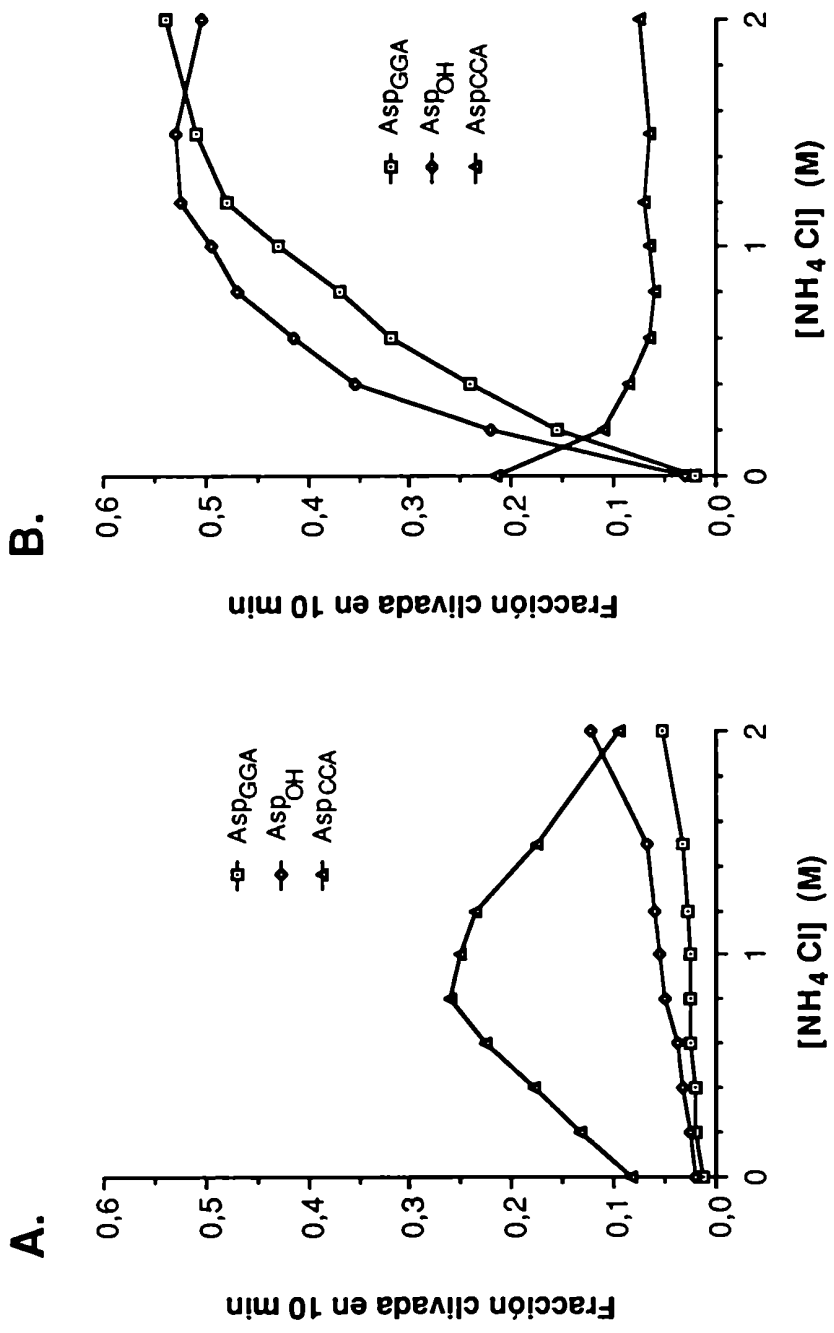


Figura 22. Extensión de la reacción por ARN P sobre los distintos precursores Asp en función de la concentración de NH₄Cl. La fracción de los distintos precursores clivada en 15 min a 37°C fue determinada. Las concentraciones de sustrato y ARN P fueron 2 x 10⁻⁷M y 3,75 x 10⁻⁹ M, respectivamente. 22A: a 50 mM MgCl₂. 22B: a 200 mM MgCl₂.

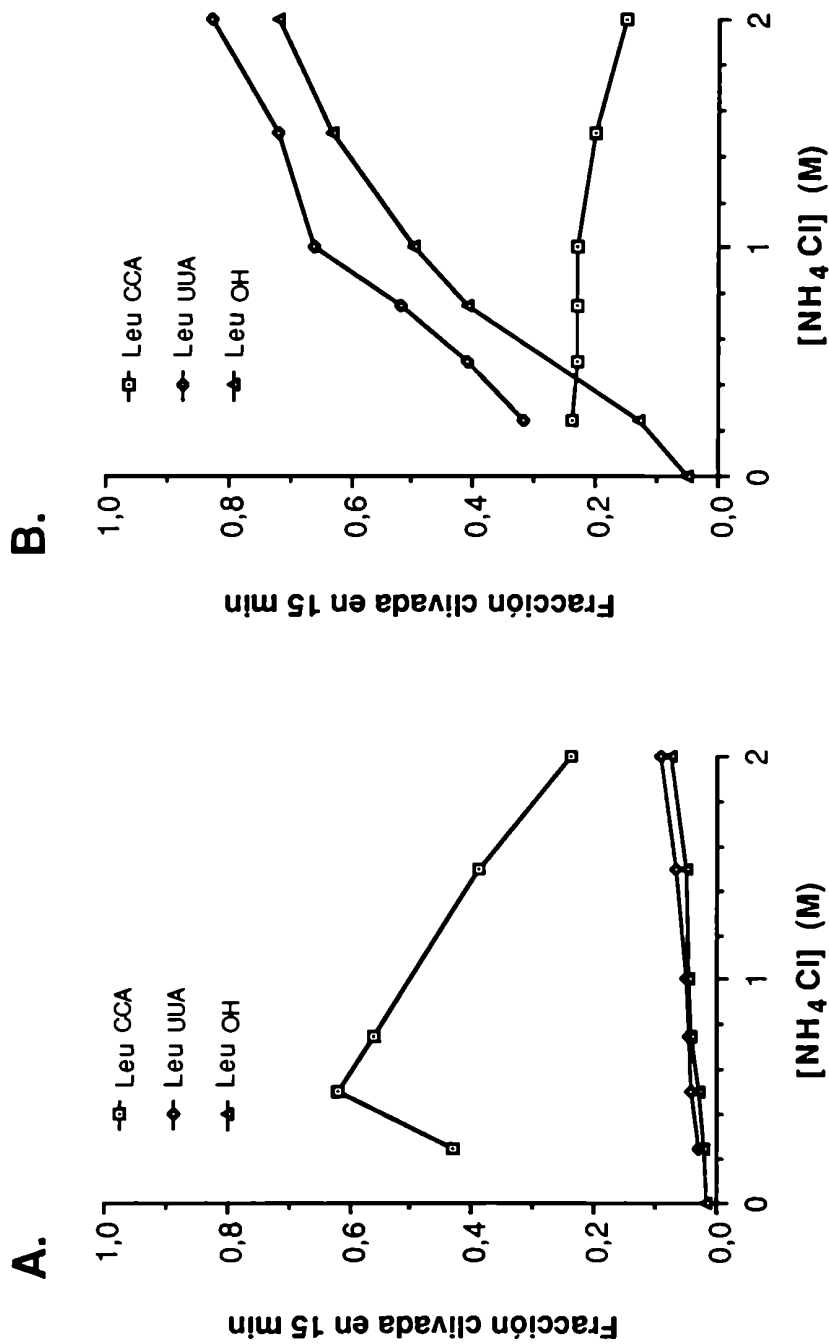


Figura 23. Extensión de la reacción por ARN P de *E. coli* sobre los distintos precursores Leu en función de la concentración de NH₄Cl.

La fracción de los distintos precursores clivada en 15 min a 37°C fue determinada. Las concentraciones de sustrato y ARN P fueron $2 \times 10^{-7} M$ y $7,5 \times 10^{-9} M$, respectivamente. 23A: a 25 mM MgCl₂. 23B: a 100 mM MgCl₂.

concentraciones más elevadas de cationes, la actividad sobre estos precursores es tan evidente y del mismo orden de magnitud que sobre el precursor con CCA en sus condiciones óptimas.

Determinación de los parámetros cinéticos K_m y v_{max} para los diferentes sustratos

Para tratar de determinar la influencia de la secuencia 3'-terminal CCA, los diferentes sustratos fueron analizados cinéticamente y las constantes K_m y v_{max} fueron evaluadas, tanto para la reacción catalizada por la holoenzima como por el ARN P.

La Figura 24 muestra un gráfico doble-recíproco (Lineweaver-Burk) para el procesamiento de los diferentes pre-ARN_t^{ASP} por la holoenzima. Los datos fueron obtenidos de la misma manera que anteriormente. El precursor-CCA muestra una constante de Michaelis menor y una velocidad máxima mayor que el pre-ARN_t^{ASP} usado en los estudios cinéticos de la sección anterior (datos no presentados). Probablemente esto se deba al hecho de que los 10 nucleótidos extra en el término 3' de este último imponen impedimento estérico en la reacción; estas secuencias se encuentran adyacentes al sitio de procesamiento por la ARNasa P en la estructura tridimensional de la molécula y es concebible que su presencia afecte la reacción. El precursor-CCA presenta un K_m menor que los otros dos, indicando que este sustrato se compleja con la enzima más eficientemente (K_m puede interpretarse como una medida de la afinidad de la enzima por el sustrato); los precursores -OH y -GGA presentan un K_m mucho mayor, indicando la menor afinidad de la enzima por estos sustratos. La situación es inversa en cuanto a la velocidad máxima de las reacciones se refiere; la reacción sobre el precursor-CCA presenta una v_{max} menor que en

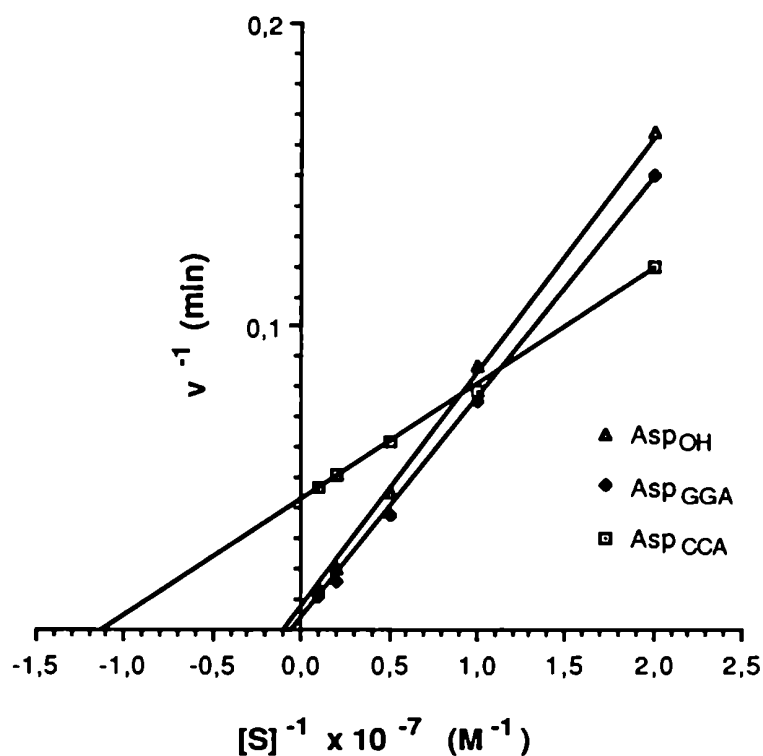


Figura 24. Análisis cinético de la reacción por la holoenzima sobre los distintos precursores Asp.

Gráfico Lineweaver-Burk de la reacción catalizada por la holoenzima sobre los distintos precursores Asp. La concentración de enzima fue $1,5 \times 10^{-9} \text{ M}$. Las condiciones iónicas fueron $100 \text{ mM NH}_4\text{Cl} / 15 \text{ mM MgCl}_2$.

los otros dos casos. Ambos tipos de precursores (con o sin CCA) pueden ser clivados con eficiencias comparables, pero a distintas condiciones iónicas; esto indica que el término CCA no es importante mecanísticamente en el proceso de catálisis *per se*, sino que probablemente contribuya energéticamente a la formación del complejo enzima-sustrato. En resumen, la presencia de la secuencia 3' CCA aumenta la afinidad de la enzima por el sustrato, y al mismo tiempo disminuye la velocidad de la reacción. Es interesante notar que a concentraciones fisiológicas de precursor (del orden de $10^{-7} M$) la reacción sobre todos los sustratos ocurre con la misma eficiencia; y por lo tanto es posible especular que *in vivo* la enzima no muestra preferencia por un tipo de sustrato.

Cuando se determinan las constantes cinéticas para la reacción catalizada por el ARN P, a las diferentes condiciones óptimas para los distintos sustratos (Figura 25), se observa que el K_m del precursor que contiene CCA es, como en el caso de la reacción por la holoenzima, menor que el de los precursores que no contienen esta secuencia. Evidentemente, la secuencia CCA provee un sitio de contacto para el ARN P; éste podría involucrar un residuo de citidina, ya que el precursor que contiene GGA se comporta de la misma manera que el que presenta el extremo romo. Los precursores sin CCA presentan mayores v_{max} ; probablemente esto se deba a un aumento en la velocidad con que el producto clivado se disocia de la superficie de la enzima, ya que, como se ha demostrado anteriormente, el paso limitante en la reacción del ARN P es la disociación del producto.

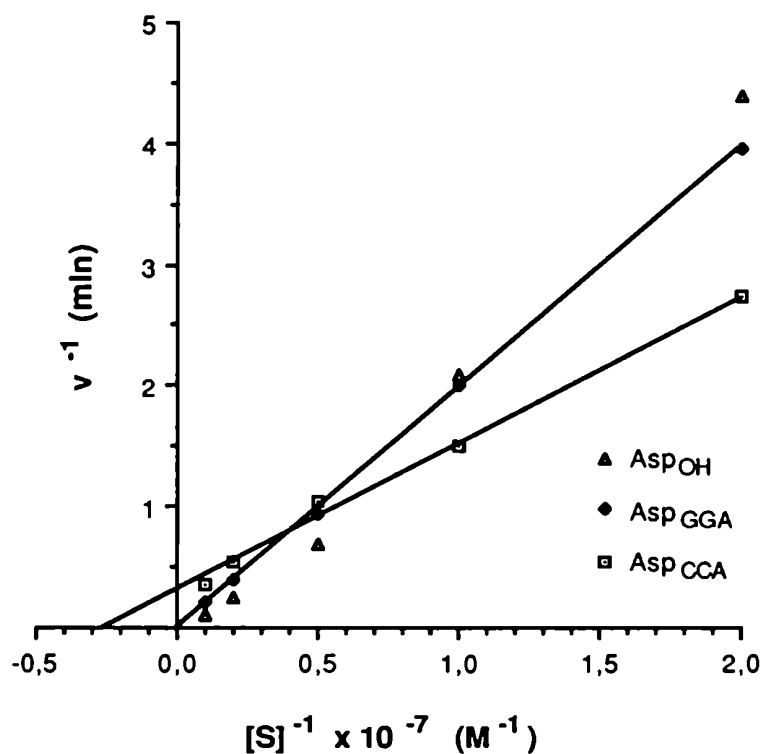


Figura 25. Análisis cinético de la reacción por ARN P sobre los distintos precursores Asp.

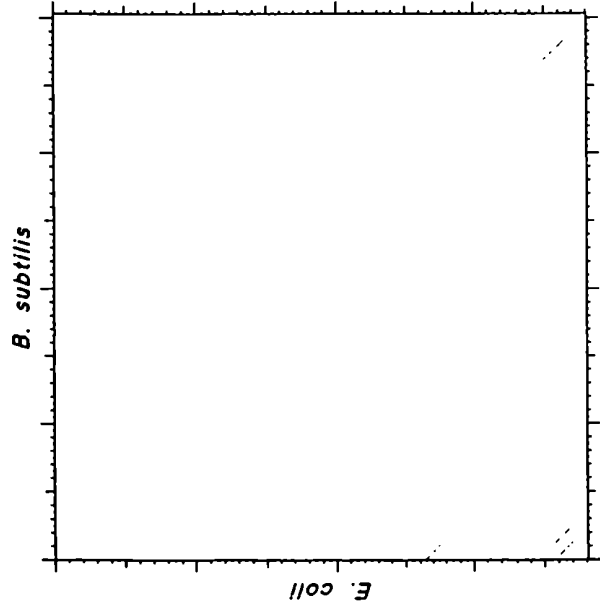
Gráfico Lineweaver-Burk de la reacción catalizada por el ARN P sobre los distintos precursores Asp en sus respectivas condiciones óptimas. La concentración de ARN enzima fue $3,75 \times 10^{-9} M$. Para el precursor AspCCA las condiciones iónicas fueron $600 mM NH_4Cl / 25 mM MgCl_2$; para los precursores ASPOH y AspGGA las condiciones iónicas fueron $800 mM NH_4Cl / 100 mM MgCl_2$.

Estructura secundaria del ARN P

Un elemento importante en la caracterización de un ARN es la elucidación de su estructura secundaria. Esto es particularmente interesante en este caso, en que se trata de una molécula tan inusual y con propiedades catalíticas. Por analogía con lo que ocurre en proteínas enzimáticas (Creighton, 1983), en las cuales el sitio activo resulta de la posición tridimensional de aminoácidos que pueden estar distribuidos a lo largo de toda la secuencia, los elementos en el ARN P responsables de la catálisis también deben buscarse en las estructuras de orden superior (secundaria y terciaria) de la molécula. Elucidar la estructura secundaria de un ARN es un proceso complejo; como se ha presentado en la sección Antecedentes, el mejor método *a priori* es el de comparación filogenética (Fox & Woese, 1975; Noller & Woese, 1981).

Con tal fin, y contando con las secuencias de los ARN P de *E. coli* (Reed *et al.*, 1982; Sakamoto *et al.*, 1983a) y *B. subtilis* (Reich *et al.*, 1986; esta tesis), se trató de compararlas. Contrariamente a lo esperado, las secuencias resultaron tan disímiles que no fue posible alinearlas en la mayor parte de su extensión (Reich *et al.*, 1986). Esto se evidencia en la Figura 26A, que presenta un gráfico mostrando las regiones en ambas secuencias en las cuales por lo menos 9 de 12 nucleótidos consecutivos son idénticos. Como término de comparación, en la Figura 26B se presenta este mismo análisis efectuado sobre los 400 nucleótidos del extremo 5' del ARN_r 16S de ambos organismos; en este caso, las regiones de similitud en secuencia son evidentes y la identificación de regiones homólogas y su alineación no presenta problemas. El problema es aún más complicado cuando se considera la diferencia de tamaño de ambos ARN (377 nucleótidos en *E. coli* versus 400-401 en *B. subtilis*). Cuando las moléculas se alinean tratando de maximizar homología

A. ARN P



B. ARNr 16S (término 5')

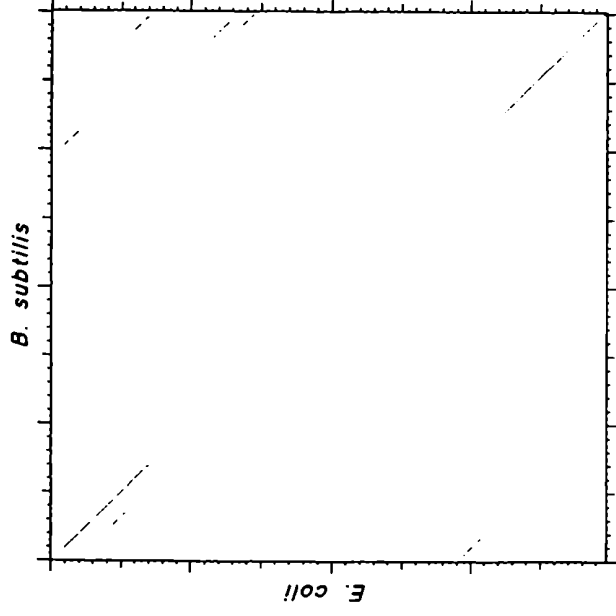


Figura 26. Comparación de ARN homólogos de *B. subtilis* y *E. coli*.

Los puntos indican regiones en las cuales las secuencias son idénticas por lo menos en 9 de 12 nucleótidos consecutivos. 26A: comparación de los ARN P. 26B: comparación de los primeros 400 nucleótidos del ARNr 16S de *B. subtilis* con la región correspondiente (396 nucleótidos) del ARNr 16S de *E. coli*.

en estructura primaria, la similitud es de 43% (Reich *et al.*, 1986); en el caso de los ARN_r 16S la similitud entre ambos organismos es de 76%.

Es evidente que la estructura primaria del ARN P ha cambiado más rápidamente en el curso de la evolución que los ARN ribosomales. Por lo tanto, para la comparación filogenética fue necesario examinar los ARN P de organismos relacionados más cercanamente, tanto a *E. coli* como a *B. subtilis*. Para elegir organismos apropiados, se utilizó el esquema evolutivo cuantitativo basado en secuencias de ARN ribosomales (Woese, 1987); en este caso se buscaron organismos cuyos ARN_r 5S presentaran homologías de 75-80%. Los organismos elegidos fueron *Bacillus megaterium*, *Bacillus brevis* y *Bacillus stearothermophilus*, todos ellos relacionados específicamente con *B. subtilis* (y pertenecientes al mismo *phylum*); y *Pseudomonas fluorescens*, perteneciente al mismo *phylum* que *E. coli*. Los genes para los ARN P fueron clonados y secuenciados (James *et al.*, 1988a). La comparación de secuencias dentro de cada uno de los *phyla* (en las cuales la similitud es de 65-75%) permite alinear las moléculas de forma convincente y provee evidencia para ciertas hélices; comparando las estructuras perfectamente conservadas en los dos casos, fue posible alinear las secuencias de ambos grupos utilizando estas hélices como mojones en la alineación. Estos caracteres permitieron identificar elementos de estructura primaria y secundaria comunes a todos los ARN analizados. El modelo de estructura secundaria propuesto para el ARN P de *B. subtilis* se presenta en la Figura 27. El modelo postulado es mínimamente estructurado; existen regiones que se presentan como desestructuradas que podrían formar hélices pero para las cuales no existe evidencia filogenética, ya que la secuencia en esa región no varía en los distintos organismos examinados. Las regiones de doble cadena en este modelo están sustentadas por dos o más

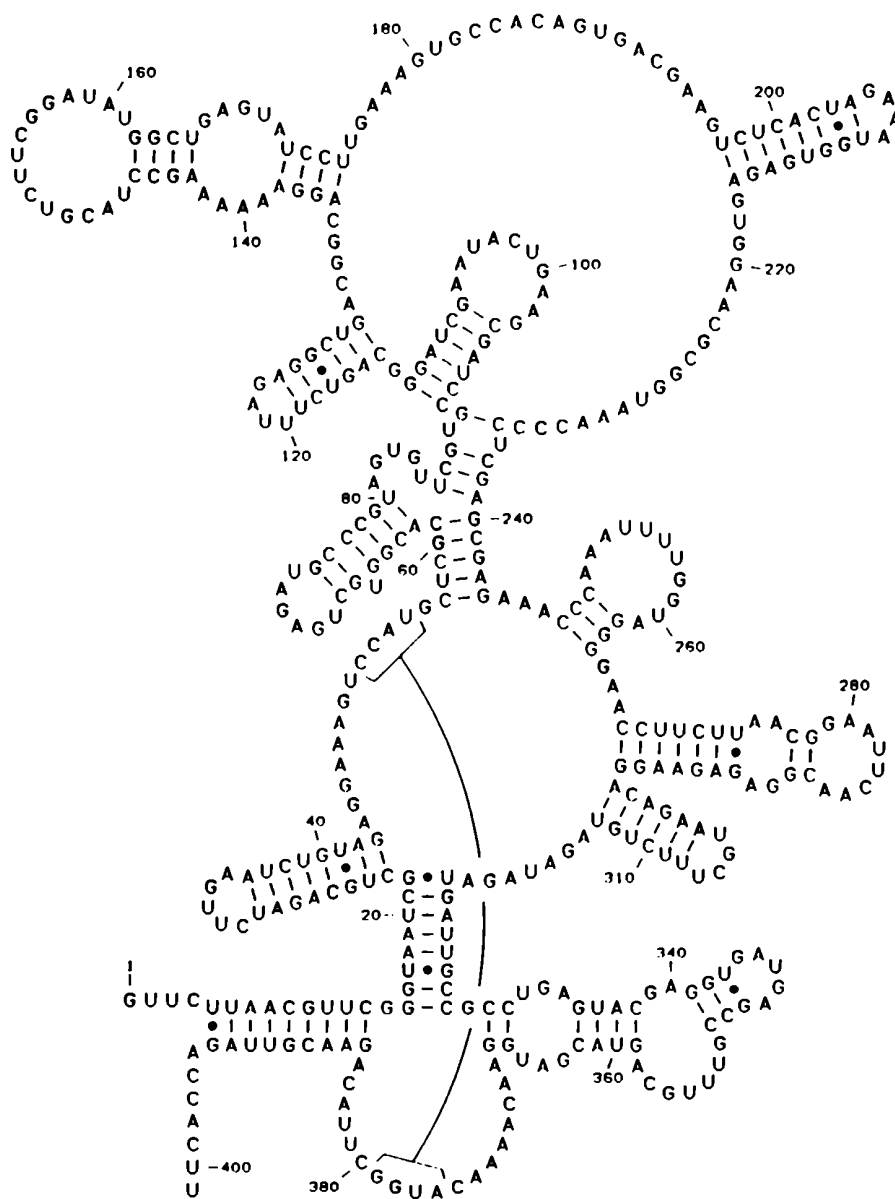


Figura 27. Modelo de estructura secundaria para el ARN P de *B. subtilis*.

Este modelo está basado en comparaciones filogenéticas. Sólo aquellas regiones para las cuales existe prueba de la estructura se muestran formando hélices. Las secuencias complementarias conectadas por el arco forman un "pseudonudo".

covariaciones, tal que la complementaridad se mantiene. El modelo propuesto es satisfactorio en el sentido que, en todos los organismos considerados, el "corazón" de la molécula se mantiene; las considerables diferencias en el largo (por ejemplo, en el caso de *B. subtilis* y *E. coli*) se deben a la adición o deleción de regiones o dominios periféricos.

DISCUSION

Clonado y secuencia del gen para el componente ribonucleico de la ARNasa P

El aislamiento del gen para el ARN P de *B. subtilis* resultó inusualmente difícil. En un principio, la sonda radiactiva utilizada para la detección de posibles clones recombinantes presentó numerosos problemas. El ARN P es una especie molecular poco abundante (estimada en aproximadamente 50 moléculas/célula) y sus terminos no son buenos sustratos para las enzimas polinucleotidil kinasa y ARN ligasa, usadas para marcar el ARN en ambos terminos para experimentos de hibridización. Ambos hechos se combinan para hacer difícil la obtención de un *probe* radiactivo específico, ya que los ARN contaminantes en la preparación de ARN P causan señales positivas espúreas (datos no presentados). El diseño de un método alternativo de síntesis del *probe*, en forma de un cADN (Materiales y Métodos) fue absolutamente necesario para la identificación de clones recombinantes. El hecho que regiones del cromosoma cercanas al gen para el ARN P fueran objeto de reordenamientos y deleciones (Reich *et al.*, 1986) hizo imposible el clonado del gen entero en un principio; tuvo que diseñarse una estrategia que permitiera el clonado por separado de las regiones 5' y 3' del gen, y sólo después de eliminar las secuencias adyacentes, fue posible unir ambos fragmentos en un vehículo estable. Esta misma estrategia tuvo que ser

utilizada para clonar el gen homólogo de *B. stearothermophilus* (James *et al.*, 1988a).

El gen para el ARN P de *B. subtilis* contiene elementos comunes a muchas unidades transcripcionales de procariotes (ver Figura 4). Adyacente al término 5' del dominio maduro se puede observar una secuencia que podría ser el promotor; existe un *box* -10 y un *box* -35 muy semejantes a los descritos como consenso para genes de *B. subtilis* (Ogasawara *et al.*, 1983); existe también una región rica en residuos A, que también se observa en otros genes pero cuyo significado funcional no ha sido determinado (Ogasawara *et al.*, 1983). La posición de estas secuencias sería coherente con el comienzo de la transcripción en el residuo G al término 5' de la región correspondiente al dominio maduro de la molécula (Reich *et al.*, 1986).

Existe un segundo posible promotor para el gen, desplazado 15 pares de bases del descrito anteriormente; en este caso también es posible identificar *boxes* -10 y -35 semejantes al consenso. Sin embargo, no se ha observado la existencia de otra especie de ARN P que contenga 15 nucleótidos más en el término 5'; existe la posibilidad de que se trate de una especie menos abundante o que es procesada rápidamente a la versión funcional más corta. Es posible que los dos promotores sean funcionales y que permitan un control sutil de la expresión del gen. Ninguno de los dos posibles promotores se adhiere estrictamente al consenso para otros genes de *B. subtilis* (Ogasawara *et al.*, 1983); este hecho no es sorprendente ya que el ARN P es una especie molecular poco abundante, mientras que las secuencias consenso fueron inferidas de la comparación de unidades transcripcionales de ARN ribosomales, que son muy abundantes en la célula.

La secuencia de los primeros siete nucleótidos del ARN P presenta sólo una desviación de la secuencia consenso de varios ARN estables en *B. subtilis* (Ogasawara *et al.*, 1983). Estos autores sugieren que esta secuencia sería importante en la regulación de la transcripción; probablemente estaría involucrada en el "control riguroso" mediado por ppGpp (Travers, 1980). Si bien no existe información sobre aspectos regulatorios del ARN P de *B. subtilis*, en *E. coli* la transcripción del gen para el ARN P está bajo dicho control riguroso (Reed *et al.*, 1982).

Veinte pares de bases más allá del término 3' del dominio maduro del gen es posible observar secuencias repetidas inversas; estas secuencias, transcriptas en un ARN, son capaces de formar una estructura conteniendo un pedúnculo de 9 pares de bases con una región apical de cadena simple de 7 nucleótidos. Esta estructura es semejante a muchos sitios de terminación de transcripción independientes del factor rho (Rosenberg & Court, 1979). No existe evidencia de que este sitio sea efectivamente usado para terminar la transcripción del ARN P. Si este sitio de terminación es usado por *B. subtilis*, entonces el término 3' de la molécula madura debe ser generado por algún evento posttranscripcional. Es interesante notar que en *E. coli* el ARN P es transcripto como un ARN de 412 nucleótidos, que es procesado para generar el término 3' maduro (Gurewitz *et al.*, 1983; Sakamoto *et al.*, 1983). En otros organismos Gram negativos se ha observado un procesamiento semejante (Lawrence *et al.*, 1987).

La secuencia para una posible proteína de 80 aminoácidos comienza 97 pares de bases más allá del término 3' del dominio maduro del gen; esta secuencia está precedida por una región corta rica en residuos G, análoga a la secuencia de Shine-Dalgarno (Shine & Dalgarno, 1974); pero no es posible

identificar un promotor. Existe otra secuencia 287 pares de bases más allá del término 3' que se extiende por 53 posibles codones hasta el final de la región clonada; no es posible identificar en este caso ni una secuencia Shine-Dalgarno ni un promotor; además, el hecho que esta posible región codificadora coincida en parte con la primera, disminuye su credibilidad como región a traducir.

La composición de bases del ARN P de *B. subtilis* es 28:20:28:23 (porcentaje A:C:G:U), mucho más uniforme que en el caso de *E. coli* (donde la composición es 23:27:35:15) (Reed *et al.*, 1982; Sakamoto *et al.*, 1983a). Como consecuencia de la composición más uniforme, existen menos secuencias cortas (de 6 a 20 nucleótidos) directamente repetidas que en el caso de *E. coli*. El hecho que estas secuencias no ocurren en *B. subtilis* probablemente indique que no son importantes funcionalmente.

La comparación de las secuencias para los ARN P de *B. subtilis* y *E. coli* arrojó resultados totalmente inesperados; las secuencias son tan diferentes (sólo 43% de homología) que no es posible alinearlas con credibilidad. Esto indica que esta molécula ha cambiado rápidamente durante el curso de la evolución; por lo menos, más rápidamente que los ARN ribosomales, en los cuales la homología a nivel de estructura primaria entre estos dos organismos es de 76%.

La reacción catalizada por la holoenzima y por el ARN P

In vivo y en condiciones fisiológicas (baja fuerza iónica) *in vitro* la ARNasa P requiere ambos componentes (proteico y ribonucleico) para

efectuar catálisis. Sin embargo, a altas concentraciones de cationes mono- y divalentes, el ARN solo es capaz de procesar precursores correctamente (Guerrier-Takada *et al.*, 1983). Este fue el primer caso descrito de un ARN que se comporta como un catalizador biológico [definido como una macromolécula que (a) acelera la velocidad de una reacción proveyendo un camino alternativo con menor energía de activación; (b) es altamente específica con respecto a los sustratos sobre los cuales actúa y los productos que genera; y (3) no es consumida durante la reacción, tal que una molécula de enzima es capaz de procesar secuencialmente varias moléculas de sustrato (Jencks, 1969)].

El intrón del ARN ribosomal 26S de *Tetrahymena* (Kruger *et al.*, 1982), el único precedente hasta el momento de un ARN catalítico, es muy diferente mecanísticamente del ARN P. En primer lugar, se trata de una molécula que promueve su propia catálisis; por lo tanto interviene en la reacción y es consumida durante el proceso; además es modificada durante la reacción por el agregado de un residuo de guanosina (que es necesario como cofactor) en el extremo 5' (Cech & Bass, 1986). Sin embargo, es posible manipular *in vitro* la molécula tal que la actividad catalítica se separe del sustrato. Los elegantes experimentos de Szostak (Szostak, 1986) prueban que el intrón puede ser convertido en una enzima que cumple con todos los requisitos de un catalizador biológico. Es interesante notar que la reacción intermolecular requiere concentraciones más elevadas de Mg^{2+} (40 mM) que la reacción intramolecular (5 mM); la temperatura óptima es también más elevada (58°C).

La reacción por ARN P presenta características típicas de reacciones catalizadas por proteínas enzimáticas. Como se presenta en las Figuras 10 y 11, el ARN enzima es reusado en ciclos consecutivos de clivaje y su actividad

es proporcional al tiempo de incubación y a la cantidad de enzima presente. Guerrier-Takada y colegas (Guerrier-Takada *et al.*, 1986) han propuesto que en *E. coli* el ARN P forma dímeros, y que ésta es la forma requerida para efectuar catálisis en ausencia del componente proteico. Esta contención se basa en la observación que la actividad del ARN P presenta una cinética de segundo orden en función de la concentración del ARN catalítico. En esta tesis no fue posible confirmar estos resultados. Como se muestra en la Figura 10, la actividad es directamente proporcional a la cantidad de ARN enzima, tanto en el caso de *E. coli* como de *B. subtilis*. El hecho que estos autores observan un *lag* en la cinética podría ser un artefacto debido al modo de purificación del ARN P usado; el esquema de purificación que utilizan no incluye Mg^{2+} en los buffers de resuspensión (en estos estudios, el ARN P sintetizado *in vitro* es resuspendido en buffer que contiene 3 mM Mg^{2+}).

La explicación más sencilla para el requerimiento de altas concentraciones de cationes para manifestar la actividad enzimática del ARN P es que éstos disminuyen la repulsión electrostática entre las dos moléculas de ARN intervinientes en la reacción. Los ARN son macromoléculas polianiónicas que contienen una carga negativa por nucleótido; sin este efecto de contracción, la repulsión electrostática impediría el íntimo contacto requerido para la catálisis. El hecho que la proteína P es de carácter básico sugiere que, por lo menos en parte, su rol sería el de proveer titulación de cargas; dado que la proteína es pequeña comparada con el ARN P, es probable que este efecto sea localizado, quizás a la región de interacción con el sustrato.

El estudio cinético de la reacción catalizada por el ARN P a distintas concentraciones de cationes (Figura 15A) muestra que cambios en el ambiente iónico influyen la afinidad de la enzima por el sustrato (como se evidencia

en los cambios en K_m); este hecho es consistente con la noción que las altas concentraciones de cationes son necesarias, por lo menos en parte, para titular la repulsión electrostática. Es poco probable que la presencia de cationes promueva una transición conformacional de la enzima a una forma más activa, ya que esto se hubiera manifestado en cambios en v_{max} , que no se observan. Sin embargo, el efecto parece no ser puramente electrostático, ya que la dependencia sobre la presencia de cationes no se relaciona directamente con la fuerza iónica (calculada a partir de la contribución de cada uno de los iones presentes en el medio de reacción) (datos no presentados); además, la reacción tiene un requerimiento específico por Mg^{2+} (Gardiner *et al.*, 1985).

La reacción catalizada por el ARN P en condiciones óptimas y la catalizada por la holoenzima muestran K_m semejantes (Figura 15B), indicando que ambos son capaces de formar el complejo enzima-sustrato con igual facilidad y que probablemente ejerzan la misma influencia sobre el proceso. El hecho que la presencia de altas concentraciones de cationes provee una influencia de tipo no específico, hace pensar que la proteína también cumple una función eminentemente electrostática.

Sin embargo, la proteína tiene una influencia sobre la reacción que no es imitada por la alta concentración de cationes: la velocidad máxima de la reacción catalizada por la holoenzima es aproximadamente 20 veces mayor que la catalizada por el ARN P. La proteína podría proveer grupos catalíticamente activos, o podría incrementar la afinidad para el sustrato, o podría permitir la disociación rápida del producto de la superficie del ARN P una vez efectuada la catálisis, y así aumentar la velocidad con que las moléculas precursoras son procesadas.

Para elucidar el rol de la proteína, las velocidades iniciales en reacciones con una relación sustrato:enzima de 2:1 fueron analizadas ; esto permite la cuantificación precisa de la extensión de la reacción durante el primer ciclo de clivaje. La influencia de la proteína sobre la disociación del producto fue evaluada "cargando" el ARN P con producto (ARN_t maduro) antes de agregar sustrato; si el producto se disocia lentamente, el primer ciclo de clivaje sería más lento que el observado con el agregado simultáneo de sustrato y producto.

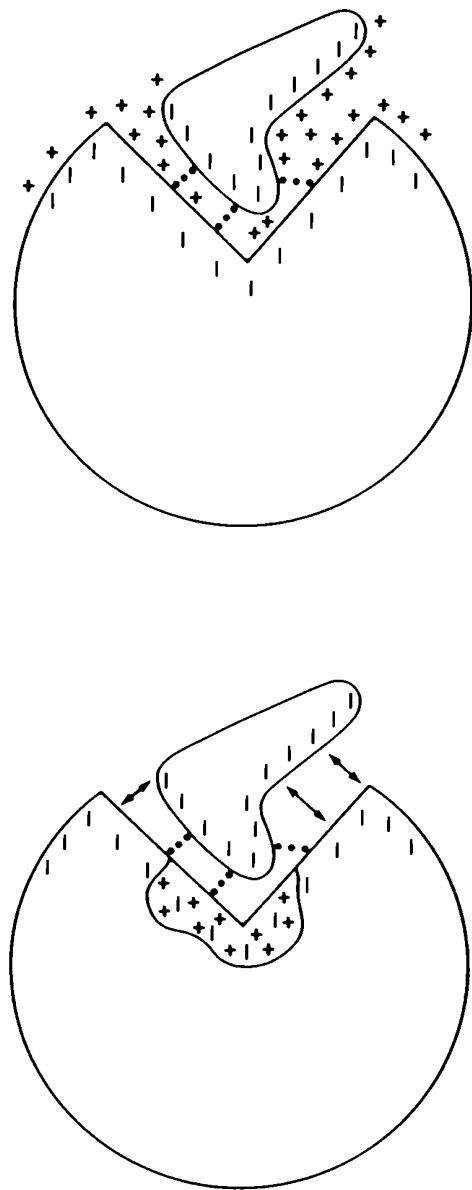
Como se observa en la Figura 18, al iniciar la reacción por ARN P con sustrato, hay un primer ciclo de clivaje rápido (que se completa en 15 segundos) durante el cual la cantidad de sustrato clivado es estequiométrica con la cantidad de enzima. Este primer ciclo es más rápido en la reacción por ARN P que en la reacción catalizada por la holoenzima. Esto parece indicar que la acción de la proteína no es ejercida en la etapa de formación del complejo enzima-sustrato o en el mecanismo catalítico *per se*.

Cuando la reacción por ARN P se inicia con el agregado simultáneo de sustrato y producto, este primer ciclo de clivaje disminuye, consistente con la dilución del sustrato por el producto. Esto indica que la enzima no discrimina entre ambos, y por lo tanto los elementos de reconocimiento deben existir en el dominio maduro del precursor. Esta contención está avalada por estudios genéticos con el fago T₄ (Mazzara & McClain, 1980) y por estudios cinéticos presentados aquí: el producto es un inhibidor competitivo de la reacción con $K_i \approx K_m$ (Figuras 16 y 17). Sin embargo, cuando el ARN P es preincubado con producto, previo al agregado de sustrato, el ciclo inicial de clivaje prácticamente desaparece (Figura 18). Esto indica que el producto no se disocia rápidamente de la superficie de la enzima, impidiendo el posterior acceso de moléculas de sustrato. La holoenzima no presenta este

comportamiento cuando se preincuba con producto, lo que indica que en este caso la disociación del producto no es un paso limitante en la reacción.

Estos datos sugieren un modelo cualitativo para la función de la proteína en la ARNasa P. Este modelo se presenta en la Figura 28. Para que la catálisis ocurra, la repulsión aniónica entre ARN enzima y ARN sustrato debe ser contrarrestada; tanto altas concentraciones de cationes como la proteína P son capaces de conseguir este efecto. Sin embargo, cuando la proteína está presente, la disociación del producto de la superficie de la enzima es más rápido. La proteína P es de carácter básico y pequeña comparada con el ARN P y puede proveer sólo una titulación localizada de cargas en condiciones fisiológicas. No podría contrarrestar toda la repulsión electrostática entre sustrato y ARN P, permitiendo la liberación del producto una vez procesado. Las altas concentraciones de cationes requeridas para manifestar la actividad catalítica en el caso del ARN P solo, tendrían el efecto de titular cargas no específicamente, disminuyendo la repulsión electrostática de manera generalizada y, por ende, aumentando el tiempo de permanencia del producto sobre la superficie de la enzima.

El ejemplo de la ARNasa P sugiere que otras proteínas que forman parte de complejos ribonucleoproteicos podrían tener una función electrostática similar. Tales proteínas proveerían zonas específicas de contraiones que podrían neutralizar la repulsión electrostática entre polinucleótidos en condiciones fisiológicas.



Holoenzima: Baja fuerza iónica



ARN P: Alta fuerza iónica



Figura 28. Modelo esquemático de la influencia de cationes y proteína P sobre la reacción catalizada por el ARN P.

Los signos (+) indican residuos cargados positivamente en la proteína P (izquierda) o cationes inorgánicos (derecha). La proteína P contrarresta la repulsión aniónica entre el ARN P y el ARN sustrato, permitiendo así la interacción entre ambos. Dado que la proteína sólo provee una titulación localizada de cargas, la repulsión intrínseca entre los dos ARN aún permanece, permitiendo la disociación del producto una vez clivado. En la reacción por ARN P solo, la alta fuerza iónica actúa de manera generalizada, tal que la disociación del producto está impedida.

Influencia de la secuencia 3' CCA sobre la actividad de la ARNasa P

Las secuencias al término 3' del dominio maduro de los ARN_t se encuentran en la vecindad de la unión química hidrolizada por la ARNasa P en la estructura tridimensional del precursor. Esta disposición espacial sugiere que cambios en la secuencia al término 3' de los precursores podrían influenciar el procesamiento del término 5'. Esta influencia podría ser de carácter estérico, o jugar un papel más determinante en la reacción, como por ejemplo proveyendo grupos que participen en la formación del complejo enzima-sustrato.

La influencia de esta secuencia sobre el procesamiento del término 5' tanto por el ARN P como por la holoenzima fue estudiada en esta tesis. Ya que en *B. subtilis* 30% de los pre-ARN_t no la codifican en sus genes (Green & Vold, 1983), se estimó importante el generar precursores *in vitro* que la contengan o no, a partir de precursores que, *in vivo*, la contengan o no. Con este fin, se aislaron y clonaron los genes para los precursores de ARN_t^{Asp} (que codifica CCA) y ARN_t^{Leu} (que no lo codifica). A partir de ambos, y como se indica en Resultados, fue posible generar precursores apropiados (Figuras 20 y 21).

Cuando los óptimos iónicos para la reacción por ARN P sobre los distintos precursores fueron determinados (Figura 22) se observó que éstos difieren de acuerdo a que contengan 3' CCA o no. Este hecho no es sorprendente, ya que existía evidencia anterior al efecto que distintos sustratos requieren distintas condiciones para ser clivados eficientemente (Reich *et al.*, 1986). Los precursores con CCA requieren concentraciones más bajas de cationes para manifestar su actividad catalítica. Si bien Altman y colegas (Guerrier-Takada

et al., 1984) sugieren que la presencia de 3' CCA es necesaria para el procesamiento por el ARN P, las condiciones de reacción que ellos emplean no son adecuadas. A moderada fuerza iónica, el clivaje de precursores sin CCA es ineficiente; pero aumentando la concentración de cationes es posible observar procesamiento de estos pre-ARN_t. Esto es demostrado en esta tesis tanto para el ARN P de *B. subtilis* como para el de *E. coli* (Figura 23).

El hecho que los precursores con CCA muestren un óptimo a concentraciones más bajas de cationes sugiere que la afinidad de la enzima por estos sustratos es mayor que en los casos en que esta secuencia no existe. Es poco probable que este hecho se deba a una catálisis más acelerada, ya que los precursores sin CCA, en condiciones apropiadas, son clivados tan eficientemente como los que lo contienen. Para confirmar esta predicción, la reacción sobre los diferentes precursores, tanto por el ARN P como por la holoenzima, fue evaluada cinéticamente (Figuras 24 y 25). Se pone en evidencia que la presencia de CCA tiene un efecto sobre la afinidad de la enzima por el precursor (el K_m del precursor con CCA es menor que el de los precursores sin CCA), tanto en el caso de la holoenzima como del ARN P. En el caso de la holoenzima, la diferencia en K_m es de aproximadamente un orden de magnitud; esto corresponde a una contribución energética del orden de 1 kcal, equivalente a una unión hidrógeno. Probablemente, uno de los dos residuos de citosina sea el involucrado en esta posible unión hidrógeno, ya que el precursor sin CCA se comporta de la misma manera que el precursor en que esta secuencia ha sido reemplazada por GGA.

Los precursores sin CCA presentan una velocidad máxima mayor que el que contiene CCA. Probablemente esto se deba a una disociación más eficiente del producto una vez clivado. Como se detalló en la sección anterior, la

velocidad de la reacción parece estar limitada por la velocidad de disociación del producto de la superficie de la enzima; en los precursores en que la contribución energética a la afinidad es mayor (como se infiere para el caso del que contiene CCA), por las mismas consideraciones electrostáticas, la liberación del producto debe ser más desfavorable.

A concentraciones fisiológicas (estimadas en $10^{-7} M$) tanto los precursores con CCA como los que no lo contienen son clivados eficientemente por la enzima; los efectos de afinidad y de velocidad intrínseca de reacción se compensan para efectuar catálisis con la misma eficiencia. Esto podría indicar que *in vivo* no existe un orden preferencial de procesamiento y que los sustratos pueden ser procesados en el término 5' independientemente de que contengan el término 3' maduro. En este sentido, es importante notar que en *B. subtilis* 30% de los pre-ARN_t no tienen la secuencia 3' CCA codificada en el gen (Green & Vold, 1983), sino que ésta es agregada posttranscripcionalmente.

Estructura secundaria del ARN P

Un estudio exhaustivo del componente ribonucleico de la ARNasa P debe incluir la elucidación de su estructura secundaria. Dado el hecho que este es un ARN inusual con funciones catalíticas, para analizar cómo es que un ARN puede actuar en catálisis y diseccionar la molécula en cuanto a sus grupos funcionales se refiere, es necesario conocer su estructura de orden superior.

Las secuencias de los ARN P de *E. coli* (Reed *et al.*, 1982; Sakamoto *et al.*, 1983) y de *B. subtilis* (Reich *et al.*, 1986; esta tesis) fueron las primeras en ser

obtenidas para estudios comparativos. Sin embargo, resultaron ser tan disímiles en estructura primaria (sólo 43% homólogas) que no pudieron ser alineadas prácticamente en todo su largo (Figura 26). Se hizo evidente que era necesaria la secuenciación de otros ARN P de especies que presentaran mayor grado de homología con ambas especies por separado. Los organismos elegidos fueron tres del género *Bacillus* (*B. stearothermophilus*, *B. brevis* y *B. megaterium*), relacionados específicamente con *B. subtilis*, y una bacteria purpúrea, *Pseudomonas fluorescens*, relacionada con *E. coli* (James *et al.*, 1988). El resultado más significativo de este análisis es que permitió elucidar una estructura común a ambos grupos de bacterias. La Figura 29 muestra las estructuras secundarias inferidas para estos organismos. De la inspección de esta figura, resulta evidente que existe una arquitectura común a todos ellos; este hecho es significativo y altamente satisfactorio dada la gran variación en estructura primaria entre los ARN P de los organismos analizados.

En algunos casos, las hélices propuestas contienen pares de bases inusuales. Por ejemplo, la hélice en *B. subtilis* 86-90/235-239 contiene una yuxtaposición U/U; sin embargo esta estructura está suficientemente confirmada con la existencia de cinco cambios compensatorios. No todos los pares de bases no canónicos son aceptables en esta hélice. Sakamoto y colegas han descrito una cepa mutante en la cual el ARN P contiene dos cambios: A por G89 y A por G365 (Sakamoto *et al.*, 1983a). La mutación en la posición G89 es responsable por el fenotipo mutante: la asociación del ARN P con la proteína P es termosensible (Shiraishi & Shimura, 1986). Según el modelo de estructura secundaria propuesto, esta mutación cambiaría el par G89-C240 (correspondiente al par G88-C237 en *B. subtilis*) a una yuxtaposición A/C. Probablemente, este cambio tomaría la hélice inestable, generando así el

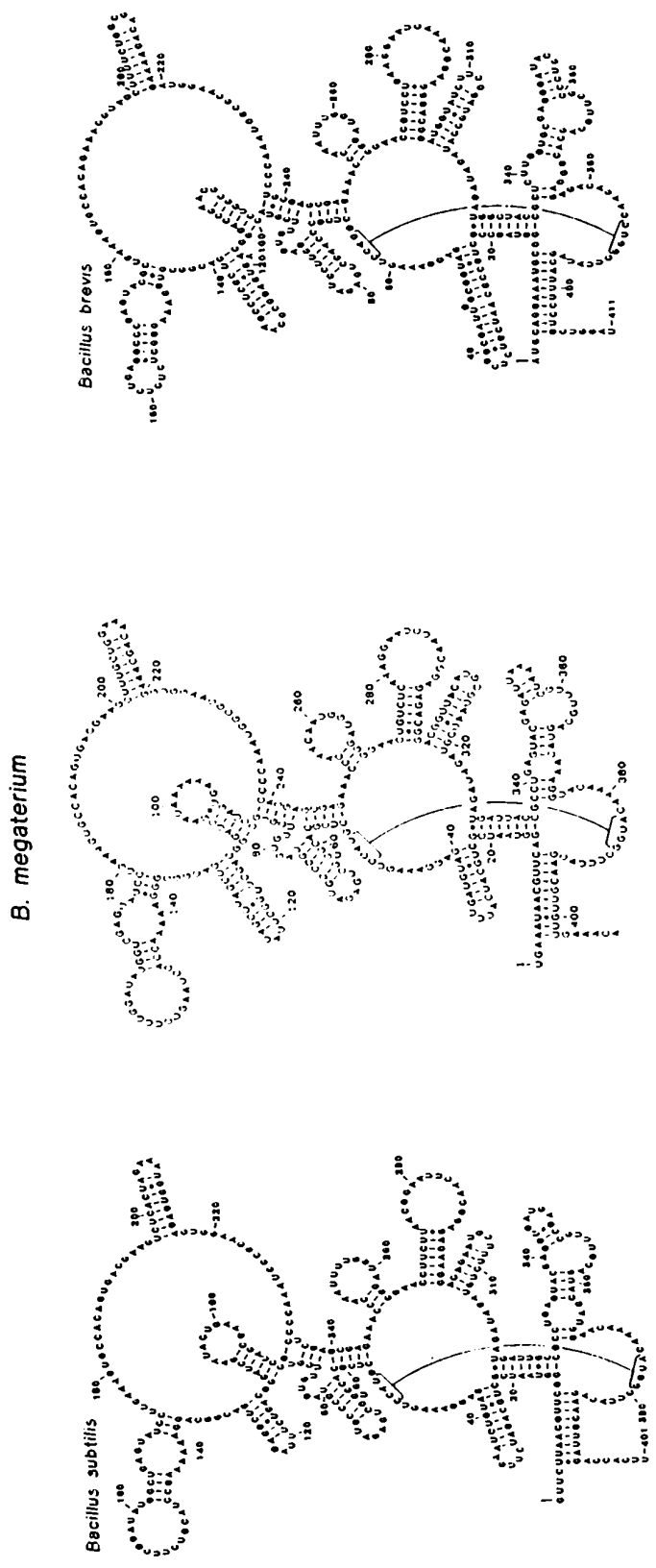
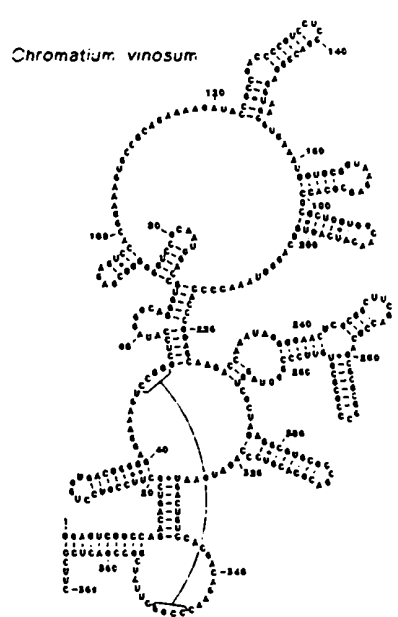
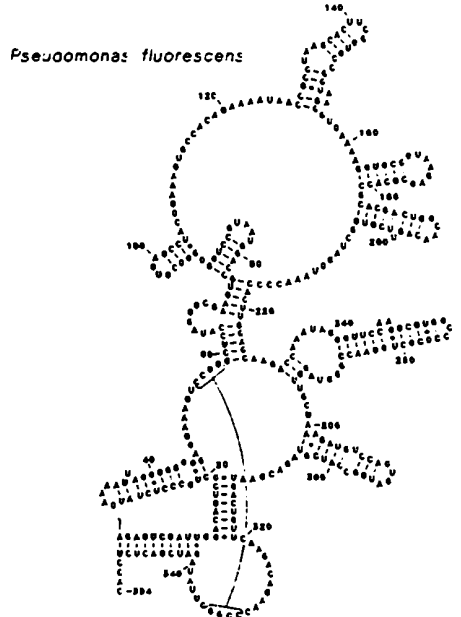
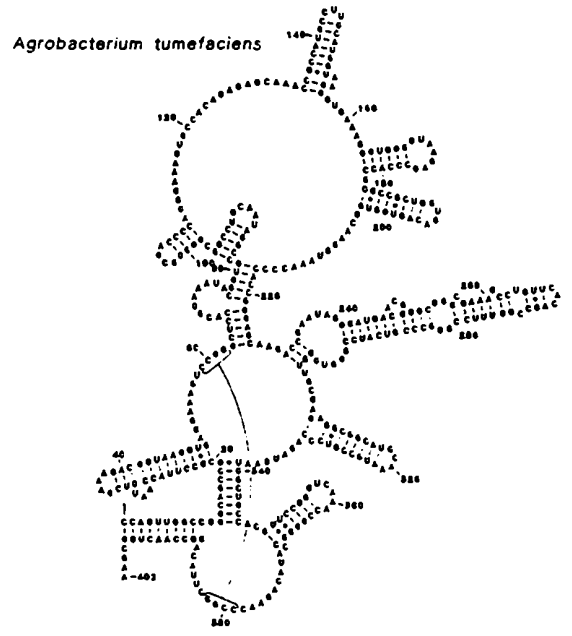
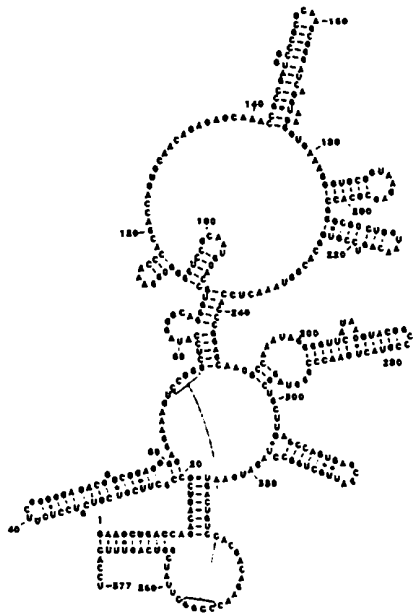


Figura 29. Estructura secundaria del ARN P de distintos organismos. Las estructuras presentadas fueron inferidas por comparación filogenética. 29A: estructuras secundarias para diferentes bacterias Gram positivas. 29B: para diferentes bacterias purpúreas.



fenotipo termosensible. Que esta región está involucrada en la interacción con la proteína está sustentada por evidencia bioquímica (Pace *et al.*, 1987). Un ARN P mutante de *B. subtilis*, que presenta una duplicación de los residuos 236-239 (y que probablemente interfiera con la hélice en cuestión) ha perdido la capacidad de responder a la proteína P, y por lo tanto no puede clivar precursores en condiciones de baja fuerza iónica en presencia de la proteína.

Analizando las estructuras para los diversos organismos, se pone de manifiesto que existen elementos que son específicos para cada grupo (Gram positivos y Gram negativos) y que aún dentro de un mismo grupo varían tanto en tamaño como en secuencia. Probablemente, estos elementos no cumplan funciones centrales en el mecanismo de acción de la enzima, y se relacionen con funciones auxiliares específicas de cada grupo. En general, las diferencias en el largo de las distintas moléculas se deben a variaciones en elementos periféricos a la estructura común, que probablemente entonces contenga los elementos esenciales requeridos para efectuar catálisis.

La mayoría de los elementos estructurales comunes a los dos *phyla* pueden formar dos pilares coaxiales. La formación de pilares coaxiales a partir de hélices es una característica muy diseminada en los ARN_r (Woese *et al.*, 1983) y en ARN_t (Kim, 1978). Esto permite organizar la molécula tridimensionalmente. La posición de las hélices conservadas en la estructura del ARN P sugiere dos pilares coaxiales; uno sería el formado por las hélices de *B. subtilis* 5-13/386-394, 15-22/321-328 y 23-30/36-43; el segundo pilar sería el formado por las hélices 53-55/376-379, 57-61/240-244 y 86-90/235-239. Las secuencias y estructuras en o alrededor de estos pilares son los elementos más conservados filogenéticamente en la molécula y es legítimo suponer que contengan los elementos enzimáticamente activos.

La posibilidad que esta estructura común contenga los elementos necesarios para la catálisis ha sido evaluada. En colaboración con el Dr. C.J. Green (Stanford Research Institute) se ha sintetizado un "minigen" que, clonado en un vehículo de expresión adecuado, puede dirigir la síntesis de un ARN que contenga sólo los elementos estructurales comunes a los dos grupo de bacterias. La estructura de este ARN, cuyo tamaño es de aproximadamente 2/3 de la molécula original, se presenta en la Figura 30. El diseño de esta molécula se basa fundamentalmente en la comparación de las secuencias de *E. coli* y *B. megaterium*.

En este ARN miniP, las hélices que en *E. coli* contienen extensiones específicas para el grupo (por ejemplo, 29-52 y 258-291) fueron acortadas para asemejarlas a las que ocurren en los organismos Gram positivos. Aquellas hélices que ocurren en los organismos del género *Bacillus* que no existen en los Gram negativos, fueron eliminadas. Además se introdujeron sitios de restricción en los extremos de la molécula que permiten el clonado del minigen en el vehículo de expresión (pT7). El minigen fue sintetizado en módulos de 30-40 oligómeros complementarios con extremos compatibles, que pueden combinarse por ligación (C.J. Green, Stanford Research Institute). El ARN miniP así sintetizado consta de 264 nucleótidos (Figura 30). Este ARN miniP ha sido evaluado en su capacidad catalítica (Pace *et al.*, comunicación personal) y se ha evidenciado que es capaz de procesar precursores promoviendo el clivaje específico de la unión fosfodiéster correcta.

Estos resultados ponen en evidencia cuán poderosa es la técnica de comparación filogenética para elucidar estructura secundaria. Además, confirman que la inferencia que estructuras conservadas filogenéticamente son importantes funcionalmente es correcta; y que es posible definir regiones en la

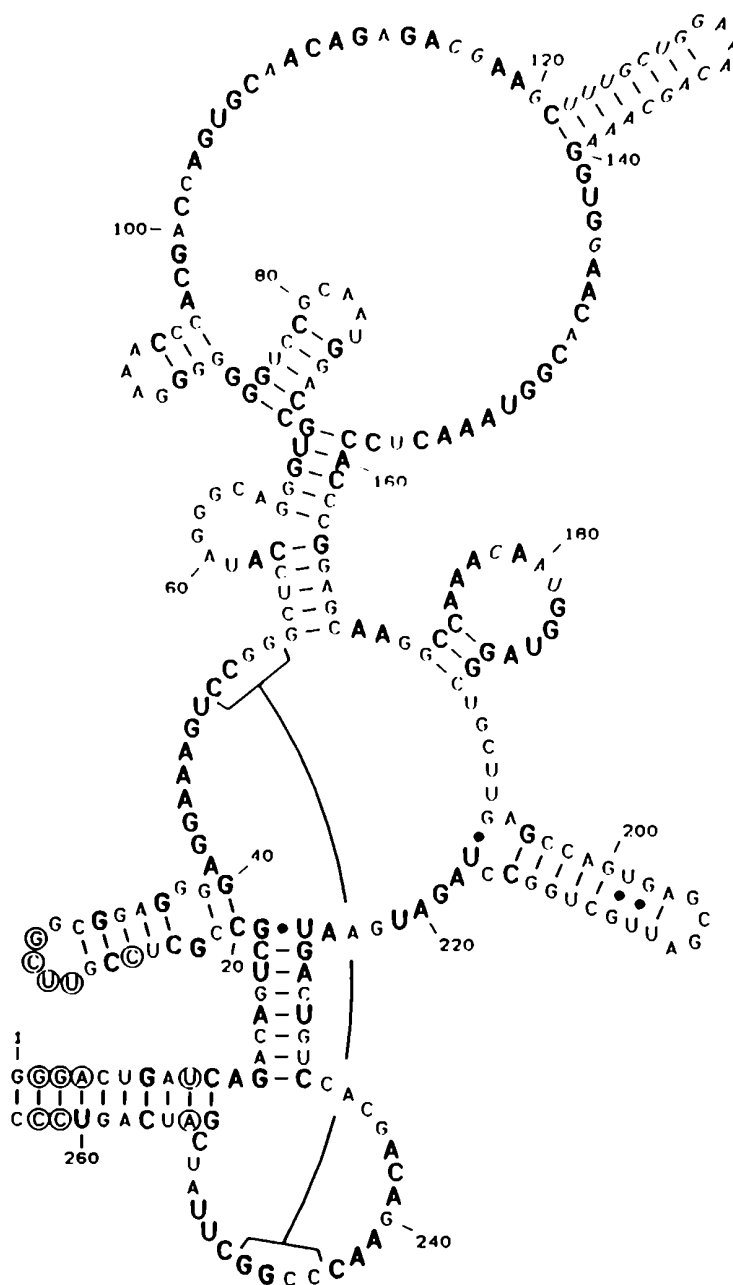


Figura 30. Estructura del ARN miniP.

Esta estructura representa la estructura mínima consenso deducida de la comparación de los ARN homólogos presentados en la Figura 29. Mayúsculas: nucleótidos de la secuencia de *E. coli*. En trazo grueso: comunes a *E. coli* y *B. megaterium*. Inclínadas: de la secuencia de *B. megaterium*. En círculo: nucleótidos introducidos durante el diseño del minigen.

estructura del ARN a las cuales pueden asignarse funciones específicas. El análisis ulterior con este ARN miniP permitirá, con aún más profundidad, la disección funcional de la molécula.

ARN como catalizador biológico

Las reacciones catalizadas por proteínas se distinguen de las no catalizadas o de las catalizadas no enzimáticamente en la velocidad y especificidad de la reacción; esto resulta de la habilidad de formar un complejo específico con el sustrato; por intermedio de interacciones no covalentes, las enzimas asumen una estructura tridimensional específica que resulta en el sitio catalítico. El ARN P exhibe parámetros cinéticos comparables a los observados en reacciones catalizadas por proteínas y la catálisis ocurre por mecanismos similares, es decir, a través de la formación de un complejo enzima-sustrato. Esto se deduce de (a) la necesidad del ARN de conservar su estructura para ser activo (Guerrier-Takada *et al.*, 1983); (b) el hecho que este ARN exhibe una cinética de tipo Michaelis-Menten (esta tesis); y (c) la especificidad manifestada por el sustrato (esta tesis).

Tanto proteínas como ARN tienen estructuras secundaria y terciaria y por lo tanto la posibilidad de formar elementos tridimensionales para el complejamiento con el sustrato. La diferencia más notable entre estos dos tipos de moléculas es la mayor homogeneidad de los ARN (las proteínas se forman a partir de la polimerización de veinte aminoácidos distintos, mientras que los ARN constan de combinaciones de sólo cuatro monómeros). Esto parece indicar que los ARN son más limitados en el tipo de reacciones que pueden catalizar. Sin embargo, es probable que los ARN catalíticos sean más

eficientes que las proteínas en formar complejos con polinucleótidos dada su capacidad de formar pares de bases. Esto no excluye la posibilidad de otro tipo de interacciones; por ejemplo, los grupos fosfato pueden ser aceptores en uniones hidrógeno o los 2'-hidroxilo pueden ser donantes (Marsh & Pace, 1985).

En discusiones sobre el origen del aparato de traducción, Crick, Orgel y Woese entre otros (Woese, 1972) contemplaron la posibilidad que los ARN podrían tener actividad catalítica. Una posible explicación para el hecho que el ARN P es catalítico es que es un remanente histórico, de tiempos anteriores a los del desarrollo completo del aparato de traducción. Esta explicación parece no muy creíble, ya que si este fuera el caso, se esperaría una arquitectura molecular constante, por lo menos tan constante como la de los ARN ribosomales o de transferencia; sin embargo, se ha demostrado aquí que se trata de una molécula muy diversa con una velocidad de cambio mucho mayor que los ARN ribosomales.

Una explicación alternativa es que el ARN P provee estructura y coordinación a varios elementos celulares que intervienen en el procesamiento de los precursores de ARN de transferencia y que formarían un complejo multienzimático (semejante al ribosoma) y que en bien de la economía celular es además un catalizador. Este hecho podría encontrar sustanciamiento en la observación que en extractos celulares de *B. subtilis* fraccionados en gradientes de sacarosa, la actividad de ARNasa P se recupera en fracciones de muy alto peso molecular, mucho mayor que si se tratara sólo de un componente ribonucleico y uno proteico (Pace, comunicación personal). Este es un concepto interesante, ya que los precursores de los ARN_t deben ser procesados de múltiples maneras (tales como metilaciones y formación de los

términos maduros), y es atractivo pensar que todos estos pasos ocurren ordenadamente en una estructura celular.

Otra posibilidad emerge del hecho que la ARNasa P tiene un papel especial en la economía celular: debe procesar los 50 o más precursores que son sintetizados, y que si bien comparten elementos comunes en su estructura tridimensional, también presentan diferencias en secuencia, tamaño de *loops*, diferentes segmentos específicos de cada precursor, etc. Los ARN son macromoléculas que presentan una mayor fluidez conformacional que las proteínas (Pace, 1983). Si bien las proteínas ofrecen una mayor variedad en cuanto a grupos catalíticos se refiere, la estructura más fluída de los ARN los hace especialmente indicados cuando se trata de interactuar con una gran variedad de sustratos de manera específica.

El consenso general hasta hace pocos años era que los ARN no serían buenos catalizadores y, si actuaron de esta manera en las primeras etapas de la vida sobre la tierra, durante el curso de la evolución las proteínas los reemplazaron en sus funciones. El descubrimiento de ARN catalíticos aporta una perspectiva totalmente diferente. En las reacciones de autoprosesamiento o en reacciones realmente enzimáticas (como es el caso del ARN P), los ARN pueden aumentar la velocidad de la reacción y ser tan específicos como las proteínas enzimáticas. Es difícil por lo tanto, considerar estos ARN como fósiles moleculares, cuyo destino es ser reemplazados por proteínas eventualmente. Parece más probable que estas moléculas han sido retenidas dado que son buenos catalizadores en reacciones que involucran otros ARN como sustratos. Probablemente sea su limitada versatilidad como catalizadores, y no su eficiencia o precisión, lo que determine que los ARN sean menos generalizados que las proteínas como catalizadores biológicos.

REFERENCIAS

- Aebi, M., Hornig, H., Padgett, R. A., Reiser, J., and Weissmann, C. 1986. Sequence requirements for splicing of higher eukaryotic nuclear pre-mRNA. *Cell* **47**: 555-565.
- Altman, S. 1978. Biosynthesis of tRNA. In *Transfer RNA*, ed. Altman, S., pp. 48-77. Cambridge, MA: MIT Press.
- Altman, S., and Guerrier-Takada, C. 1986. M1 RNA, the RNA subunit of *Escherichia coli* ribonuclease P, can undergo a pH-sensitive conformational change. *Biochemistry* **25**: 1205-1208.
- Altman, S., and Smith, J. D. 1971. Tyrosine tRNA precursor molecule polynucleotide sequence. *Nature New Biol.* **233**: 35-39.
- Asha, P. K., Blouin, R. T., Zaniewski, R., and Deutscher, M. P. 1983. Ribonuclease BN: Identification and partial characterization of a new tRNA processing enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 3301-3304.
- Baer, M. and Altman, S. 1985. A catalytic RNA and its gene from *Salmonella typhimurium*. *Science* **228**: 999-1002.
- Bass, B. L., and Cech, T. R. 1984. Specific interaction between the self-splicing RNA of *Tetrahymena* and its guanosine substrate: Implications for biological catalysis by RNA. *Nature (London)* **308**: 820-826.
- Bernhardt, D., and Darnell, J. E. 1969. tRNA synthesis in HeLa cells: A precursor to tRNA and the effects of methionine starvation on tRNA synthesis. *J. Mol. Biol.* **42**: 43-56.
- Biggin, M. D., Gibson, T. J., and Hong, G. F. 1983. Buffer gradient gels and ³⁵S label as an aid to rapid DNA sequence determination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 3963-3965.
- Birnstiel, M. L., Busslinger, M., and Strib, K. 1985. Transcription termination and 3' processing: The end is in site! *Cell* **41**: 349-359.
- Björk, G. R., Ericson, J. U., Gustafsson, C. E., Hagervall, T. G., Jönsson, Y. H., and Wikström, P. N. 1987. Transfer RNA modification. *Annu. Rev. Biochem.* **56**: 263-287.

- Black, D. L., Chabot, B., and Steitz, J. A. 1985. U2 as well as U1 small nuclear ribonucleoproteins are involved in pre-mRNA splicing. *Cell* **42**: 737-750.
- Bolivar, F., Rodriguez, R. L., Greene, P. J., Betlach, M. C., Heyneker, H. L., and Boyer, H. W. 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* **2**: 95-113.
- Bothwell, A. L. M., Garber, R. L., and Altman, S. 1976. Nucleotide sequence and *in vitro* processing of a precursor molecule to *Escherichia coli* 4.5 S RNA. *J. Biol. Chem.* **251**: 7709-7716.
- Bourgaize, D. B., and Fournier, M. J. 1987. Initiation of translation is impaired in *E. coli* cells deficient in 4.5S RNA. *Nature (London)* **325**: 281-284.
- Brehm, S. L., and Cech, T. R. 1983. Fate of an intervening sequence ribonucleic acid: Excision and cyclization of the *Tetrahymena* ribosomal ribonucleic acid intervening sequence *in vivo*. *Biochemistry* **22**: 2390-2397.
- Burdon, R. H., Martin, B. T., and Lal, B. M. 1967. Synthesis of low molecular weight ribonucleic acid in tumor cells. *J. Mol. Biol.* **28**: 357-371.
- Castaño, J. G., Omberg, R., Koster, J. G., Tobian, J. A., and Zasloff, M. 1986. Eukaryotic pre-tRNA 5' processing nuclease: Copurification with a complex cylindrical particle. *Cell* **46**: 377-387.
- Cech, T. R., and Bass, B. L. 1986. Biological catalysis by RNA. *Annu. Rev. Biochem.* **55**: 599-629.
- Cech, T. R., Tanner, N. K., Tinoco, I., Jr., Weir, B. R., Zuker, M., and Perlman, P. S. 1983. Secondary structure of the *Tetrahymena* ribosomal RNA intervening sequence: Structural homology with fungal mitochondrial intervening sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 3903-3907.
- Cech, T. R., Zaug, A. J., and Grabowski, P. J. 1981. *In vitro* splicing of the ribosomal RNA precursor of *Tetrahymena*: Involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence. *Cell* **27**: 487-496.
- Chu, F. K., Maley, G. F., Belfort, M., and Maley, F. 1985. *In vitro* expression of the intron-containing gene for T4 phage thymidylate synthase. *J. Biol. Chem.* **260**: 10680-10688.

Chuba, P. J. and Palchadhuri, S. 1986. Requirement for cysteine in the color silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **156**: 136-139.

Christofori, G., and Keller, W. 1988. 3' cleavage and polyadenylation of mRNA precursors *in vitro* requires a poly(A) polymerase, a cleavage factor, and a snRNP. *Cell* **53**: 876-889.

Creighton, T. E. 1983. *Proteins*. New York:W. H. Freeman.

Cudny, H., and Deutscher, M. P. 1988. 3' processing of tRNA precursors in ribonuclease-deficient *Escherichia coli*. Development and characterization of an *in vitro* processing system and evidence for a phosphate requirement. *J. Biol. Chem.* **263**: 1518-1523.

Cudny, H., Zaniewski, R., and Deutscher, M. P. 1981a. *Escherichia coli* RNase D. Purification and structural characterization of a putative processing nuclease. *J. Biol. Chem.* **256**: 5627-5632.

Cudny, H., Zaniewski, R., and Deutscher, M. P. 1981b. *Escherichia coli* RNase D. Catalytic properties and substrate specificity. *J. Biol. Chem.* **256**: 5633-5637.

Deutscher, M. P. 1982. tRNA nucleotidyl transferase. *The Enzymes* **15**: 183.

Deutscher, M. P., Foulds, J., and McClain, W. H. 1974. Transfer ribonucleic nucleotidyl transferase plays an essential role in the normal growth of *Escherichia coli* and in the biosynthesis of some bacteriophage T4 transfer ribonucleic acids. *J. Biol. Chem.* **249**: 6696-6699.

Deutscher, M. P., Lin, J. J.-C., and Evans, J. A. 1977. Transfer RNA metabolism in *Escherichia coli* deficient in tRNA nucleotidyltransferase. *J. Mol. Biol.* **117**: 1081-1094.

Doersen, C., Guerrier-Takada, C., Altman, S., and Attardi, G. 1985. Characterization of RNase P activity from HeLa cell mitochondria. Comparison with the cytosol RNase P activity. *J. Biol. Chem.* **260**: 5942-5949.

Dunn, J. J., and Studier, F. W. 1973. T7 early RNAs and *Escherichia coli* ribosomal RNAs are cut from large precursor RNAs *in vivo* by ribonuclease III. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **70**: 3296-3300.

- Feagin, J. E., Abraham, J. M., and Stuart, K. 1988. Extensive editing of the cytochrome c oxidase III transcript in *Trypanosoma brucei*. *Cell* **53**: 413-422.
- Fleissner, E., and Borek, E. 1962. A new enzyme of RNA synthesis: RNA methylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **48**: 1199-1203.
- Fox, G. E., and Woese, C. R. 1975. 5S RNA secondary structure. *Nature (London)* **256**: 505-507.
- Fukada, K., and Abelson, J. 1980. DNA sequence of a T4 transfer RNA gene cluster. *J. Mol. Biol.* **139**: 377-391.
- Gardiner, K. 1984. *Ribonuclease P from Bacillus subtilis*. Ph.D. dissertation, University of Colorado.
- Gardiner, K. J., Marsh, T. L., and Pace, N. R. 1985. Ion dependence of the *Bacillus subtilis* RNase P reaction. *J. Biol. Chem.* **260**: 5415-5419.
- Gardiner, K., and Pace, N. R. 1980. RNase P of *Bacillus subtilis* has a RNA component. *J. Biol. Chem.* **255**: 7507-7509.
- Garriga, G., and Lambowitz, A. M. 1984. RNA splicing in *Neurospora* mitochondria: Self-splicing of a mitochondrial intron in vitro. *Cell* **39**: 631-641.
- Garriga, G., Lambowitz, A. M., Inoue, T., and Cech, T. R. 1986. Mechanism of recognition of the 5' splice site in self-splicing group I introns. *Nature (London)* **322**: 86-89.
- Gil, A. and Proudfoot, N. J. 1984. A sequence downstream of AAUAAA is required for rabbit β -globin mRNA 3'-end formation. *Nature (London)* **312**: 473-474.
- Green, C. J. and Vold, B. S. 1983. Sequence analysis of a cluster of twenty-one tRNA genes in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res.* **11**: 5763-5774.
- Grodberg, J., and Dunn, J. J. 1988. *ompT* encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J. Bacteriol.* **170**: 1245-1253.
- Guerrier-Takada, C., and Altman, S. 1984a. Structure in solution of M1 RNA, the catalytic subunit of ribonuclease P from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **23**: 6327-6334.

Guerrier-Takada, C., and Altman, S. 1984b. Catalytic activity of an RNA molecule prepared by transcription in vitro. *Science* **223**: 285-286.

Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N., and Altman, S. 1983. The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* **35**: 849-857.

Guerrier-Takada, C., Haydock, K., Allen, L., and Altman, S. 1986. Metal ion requirements and other aspects of the reaction catalyzed by M1 RNA, the RNA subunit of ribonuclease P from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **25**: 1509-1515.

Guerrier-Takada, C., McClain, W. H., and Altman, S. 1984. Cleavage of tRNA precursors by the RNA subunit of *E. coli* ribonuclease P (M1 RNA) is influenced by 3'-proximal CCA in the substrates. *Cell* **38**: 219-224.

Gupta, R. 1984. *Halobacterium volcanii* tRNAs. *J. Biol. Chem.* **259**: 9461-9471.

Gurewitz, M., Jain, S. K., and Apirion, D. 1983. Identification of a precursor molecule for the RNA moiety of the processing enzyme RNase P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 4450-4454.

Guthrie, C. 1975. Nucleotide sequence of a dimeric precursor to glutamine and leucine transfer RNAs coded by bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* **95**: 529-547.

Guthrie, C. 1988. Genetic analysis of yeast snRNAs. In *Structure and Function of Major and Minor Small Nuclear Ribonucleoprotein Particles*, ed. Birnstiel, M. L., pp. 196-211. Berlin: Springer-Verlag.

Hansen, F. G., Hansen, E. B., and Atlung, T. 1985. Physical mapping and nucleotide sequence of the *rnpA* gene that encodes the protein component of ribonuclease P in *Escherichia coli*. *Gene* **38**: 85-93.

Hassur, J. M., and Whitlock, H. W., Jr. 1974. UV shadowing - A new and convenient method for the location of ultraviolet-absorbing species in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **59**: 162-164.

Holbrook, S. R., and Kim, S.-H. 1983. Correlation between chemical modification and surface accessibility in yeast phenylalanine transfer RNA. *Biopolymers* **22**: 1145-1166.

- James, B. D., Olsen, G. J., Liu, J., and Pace, N. R. 1988a. The secondary structure of ribonuclease P RNA, the catalytic element of a ribonucleoprotein enzyme. *Cell* **52**: 19-26.
- James, B. D., Olsen, G. J., and Pace, N. R. 1988b. Phylogenetic comparative analysis of RNA secondary structure. *Methods Enzymol.*, in press.
- Jencks, W. P. 1969. *Catalysis in Chemistry and Enzymology*. New York: McGraw-Hill.
- Johnson, P. F., and Abelson, J. 1983. The yeast tRNA^{Tyr} gene intron is essential for correct modification of its tRNA product. *Nature (London)* **302**: 681-687.
- Kaine, B. P., Gupta, R., and Woese, C. R. 1983. Putative introns in tRNA genes of prokaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 3309-3312.
- Kim, S.-H. 1978. Crystal structure of yeast tRNA^{Phe}: Its correlation to the solution structure and functional implications. In *Transfer RNA*, Altman, S., ed., pp. 248-293. Cambridge MA: MIT Press.
- Kindler, P., Keil, T. U., and Hofschneider, P. H. 1973. Isolation and characterization of a ribonuclease III deficient mutant of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **126**: 53-59.
- Koshi, R. A., Bothwell, A. L. M., and Altman, S. 1976. Identification of a ribonuclease P-like activity from human KB cells. *Cell* **9**: 101-116.
- Krämer, A., Keller, W., Appel, B., and Lührmann, R. 1984. The 5' terminus of the RNA moiety of U1 small nuclear ribonucleoprotein particles is required for the splicing of messenger RNA precursors. *Cell* **38**: 299-307.
- Kruger, K., Grabowski, P. J., Zaug, A. J., Sands, J., Gottschling, D. E., and Cech, T. R. 1982. Self-splicing RNA: Autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*. *Cell* **31**: 147-157.
- Krupp, G., Cherayil, B., Frendewey, D., Nishikawa, S., and Söll, D. 1986. Two RNA species copurify with RNase P from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J.* **5**: 1697-1703.
- Kubli, E. 1981. The structure and function of tRNA genes of higher eukaryotes. *Experientia* **37**: 1-9.

- Kunkel, T. A., Roberts, J. D., and Zakour, R. A. 1987. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods Enzymol.* **154**: 367-382.
- Lawrence, N. P., Richman, A., Amini, R., and Altman, S. 1987. Heterologous enzyme function in *Escherichia coli* and the selection of genes encoding the catalytic RNA subunit of RNase P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 6825-6829.
- Lazowska, J., Jacq, C., and Slonimski, P. P. 1980. Sequence of introns and flanking exons in wild-type and Box 3 mutants of cytochrome b reveals an interlaced splicing protein coded by an intron. *Cell* **22**: 333-348.
- Leff, S. E., Rosenfeld, M. G., and Evans, R. M. 1986. Complex transcription units: Diversity in gene expression by alternate RNA processing. *Annu. Rev. Biochem.* **55**: 1091-1117.
- Loughney, K., Lund, E., and Dahlberg, J. E. 1982. tRNA genes are found between 16S and 23S rRNA genes in *Bacillus subtilis*. 1982. *Nucleic Acids Res.* **10**: 1607-1624.
- Lozeron, H. A., Dahlberg, J. E., and Szybalski, W. 1976. Processing of the major leftward mRNA of coliphage Lambda. *Virology* **71**: 262-277.
- Lund, E., and Dahlberg, J. E. 1977. Spacer tRNAs in rRNA transcripts of *E. coli*; processing of 30S rRNA *in vitro*. *Cell* **11**: 247-262.
- Lund, E., Dahlberg, J. E., and Guthrie, C. 1980. Processing of spacer tRNAs from rRNA transcripts of *E. coli*. In *Transfer RNA: Biological Aspects*, ed. Söll, D., Abelson, J. N., and Schimmel, P. R., pp. 123-137. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Manale, A., Guthrie, C., and Colby, D. 1979. S1 nuclease as a probe for the conformation of a dimeric tRNA precursor. *Biochemistry* **18**: 77-83.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. 1982. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Marsh, T. L., and Pace, N. R. 1985. RNase P catalysis differs from ribosomal RNA self-splicing. *Science* **229**: 79-81.
- Mazzara, G. P., and McClain, W. H. 1980. tRNA synthesis. In *Transfer RNA: Biological Aspects*, ed. Söll, D., Abelson, J. N., and Schimmel, P. R., pp. 3-27. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

- McClain, W. H. 1979. A role for ribonuclease III in the synthesis of bacteriophage T4 transfer RNAs. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **86**: 718-724.
- Melton, D. A., De Robertis, E. M., and Cortese, R. 1980. Order and intracellular location of the events involved in the maturation of spliced tRNA. *Nature (London)* **284**: 143-148.
- Melton, D. A., Krieg, P. A., Rebagliati, M. R., Maniatis, T., Zinn, K., and Green, M. R. 1984. Efficient *in vitro* synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucleic Acids Res.* **12**: 7035-7056.
- Messing, J. 1983. New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol.* **101**: 20-78.
- Michel, F., and Cummings, D. J. 1985. Analysis of class I introns in a mitochondrial plasmid associated with senescence of *Podospora anserina* reveals extraordinary resemblance to the *Tetrahymena* ribosomal intron. *Curr. Genet.* **10**: 69-79.
- Michel, F., and Dujon, B. 1983. Conservation of RNA secondary structures in two intron families including mitochondrial-, chloroplast-, and nuclear-encoded members. *EMBO J.* **2**: 33-38.
- Michel, F., Jacquier, A., and Dujon, B. 1982. Comparison of fungal mitochondrial introns reveals extensive homologies in RNA secondary structure. *Biochimie* **64**: 867-881.
- Morgan, E. A., Ikemura, T., Lindahl, L., Fallon, A. M., and Nomura, N. 1978. Some rRNA operons in *E. coli* have tRNA genes at their distal ends. *Cell* **13**: 335-344.
- Moriya, S., Ogasawara, N., and Yoshikawa, H. 1985. Structure and function of the region of replication origin of the *Bacillus subtilis* chromosome. III. Nucleotide sequence of some 10,000 base pairs in the origin region. *Nucleic Acids Res.* **13**: 2251-2265.
- Nikolaev, N, Silengo, L., and Schlessinger, D. 1973. A role for RNase III in the processing of ribosomal ribonucleic acid and messenger ribonucleic acid precursors in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **248**: 7967-7969.
- Ninio, J. 1979. Prediction of pairing schemes in RNA molecules-loop contributions and energy of wobble and non-wobble pairs. *Biochimie* **61**: 1133-1150.

- Noller, H. F., and Woese, C. R. 1981. Secondary structure of 16S ribosomal RNA. *Science* **212**: 403-411.
- Ogasawara, N., Moriya, S., von Meyerburg, K., Hansen, F. G., and Yoshikawa, H. 1985. Conservation of genes and their organization in the chromosomal replication origin region of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *EMBO J.* **4**: 3345-3350.
- Ogasawara, N., Moriya, S., and Yoshikawa, H. 1983. Structure and organization of rRNA operons in the region of the replication origin of the *Bacillus subtilis* chromosome. *Nucleic Acids Res.* **11**: 6301-6318.
- Pace, N. R. 1983. Protein-polynucleotide recognition and the RNA processing nucleases in prokaryotes. In *Processing of RNA*, ed. Apirion, D., pp. 1-34. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Pace, N. R., Reich, C., James, B. D., Olsen, G. J., Pace, B., and Waugh, D. S. 1987. Structure and function in ribonuclease P. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **52**: 239-248.
- Padgett, R. A., Grabowski, P. J., Konarska, M. M., Seiler, S. R., and Sharp, P. A. 1986. Splicing of messenger RNA precursors. *Annu. Rev. Biochem.* **55**: 1019-1050.
- Peattie, D. A., and Herr, W. 1981. Chemical probing of the tRNA-ribosome complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 2273-2277.
- Peebles, C. L., Perlman, P. S., Mecklenburg, K. L., Petrillo, M. L., Tabor, J. H., Jarrell, K. A., and Cheng, H.-L. 1986. A self-splicing RNA excises an intron lariat. *Cell* **44**: 213-223.
- Perry, R. P. 1976. Processing of RNA. *Annu. Rev. Biochem.* **45**: 605-629.
- Pragai, B., and Apirion, D. 1981. Processing of bacteriophage T4 tRNAs: The role of RNAase III. *J. Mol. Biol.* **153**: 619-630.
- Reed, R. E., Baer, M. F., Guerrier-Takada, C., Donis-Keller, H., and Altman, S. 1982. Nucleotide sequence of the gene encoding the RNA subunit (M1 RNA) of ribonuclease P from *Escherichia coli*. *Cell* **30**: 627-636.
- Reed, R., and Maniatis, T. 1985. Intron sequences involved in lariat formation during pre-mRNA splicing. *Cell* **41**: 95-105.

- Reich, C., Gardiner, K. J., Olsen, G. J., Pace, B., Marsh, T. L., and Pace, N. R. 1986. The RNA component of the *Bacillus subtilis* RNase P: Sequence, activity, and partial secondary structure. *J. Biol. Chem.* **261**: 7888-7893.
- Reich, C., Olsen, G. J., Pace, B., and Pace, N. R. 1988. Role of the protein moiety of ribonuclease P, a catalytic ribonucleoprotein. *Science* **239**: 178-181.
- Reich, C., Olsen, G. J., Pace, B., and Pace, N. R. 1987. The *Bacillus subtilis* RNase P: Kinetic analysis of the RNA alone and holoenzyme reactions. *Abstracts, Cold Spring Harbor Meeting on RNA processing*, May 13-17, 1987.
- Robertson, H. D., Altman, S., and Smith, J. D. 1972. Purification and properties of a specific *Escherichia coli* ribonuclease which cleaves a tyrosine transfer ribonucleic acid precursor. *J. Biol. Chem.* **247**: 5243-5251.
- Rosenberg, M., and Court, D. 1979. Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription. *Annu. Rev. Genet.* **13**: 319-353.
- Ross, P. D., and Scruggs, R. L. 1964. Electrophoresis of DNA. III. The effect of several univalent electrolytes on the mobility of DNA. *Biopolymers* **2**: 231-236.
- Saha, B., Strelow, S., and Schlessinger, D. 1983. Electrophoretic elution of nucleic acids from acrylamide and agarose gels. *J. Biochem. Biophys. Methods* **7**: 277-284.
- Sakamoto, K., Kimura, N., Nagawa, F., and Shimura, Y. 1983a. Nucleotide sequence and stability of the RNA component of RNase P from a temperature-sensitive mutant of *E. coli*. *Nucleic Acids Res.* **11**: 8237-8251.
- Sakamoto, H., Kimura, N., and Shimura, Y. 1983b. Processing of transcription products of the gene coding for the RNA component of RNase P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 6187-6191.
- Salser, W. 1977. Globin mRNA sequences: Analysis of base pairing and evolutionary implications. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **42**: 985-1002.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
- Schedl, P., and Primakoff, P. 1973. Mutants of *E. coli* thermosensitive for the synthesis of tRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**: 2091-2095.

- Schedl, P., Primakoff, P., and Roberts, J. 1975. Processing of *E. coli* tRNA precursors. *Brook. Symp. Biol.* **26**: 53-76.
- Scherrer, K., Latham, H., and Darnell, J. E. 1963. Demonstration of an unstable RNA and of a precursor to ribosomal RNA in HeLa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **49**: 240-248.
- Schimmel, P. R. 1981. 5 specific protein-tRNA interactions. *CRC Critical Rev. Biochem.* **9**: 207-251.
- Schmidt, F. J., and McClain, W. H. 1978. Alternate orders of ribonuclease P cleavage occur *in vitro* but not *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **253**: 4730-4738.
- Schmidt, F. J., Seidman, J. G., and Bock, R. M. 1976. Transfer ribonucleic acid biosynthesis: Substrate specificity of ribonuclease P. *J. Biol. Chem.* **251**: 2440-2445.
- Seidman, J. G. and McClain, W. H. 1975. Three steps in conversion of large precursor RNA into serine and proline transfer RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**: 1491-1495.
- Sharp, P. A. 1987. Splicing of messenger RNA precursors. *Science* **235**: 766-771.
- Shatkin, A. J. 1976. Capping of eukaryotic mRNA. *Cell* **9**: 645-653.
- Shaw, J. M., Feagin, J. E., Stuart, K., and Simpson, L. 1988. Editing of kinetoplastid mitochondrial mRNAs by uridine addition and deletion generates conserved aminoacid sequences and AUG initiation codons. *Cell* **53**: 401-411.
- Shine, J., and Dalgarno, L. 1974. The 3' terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: Complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**: 1342-1346.
- Shiraishi, H., and Shimura, Y. 1986. Mutations affecting two distinct functions of the RNA component of RNase P. *EMBO J.* **5**: 3673-3679.
- Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequence among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-518.
- Stark, B. C., Kole, R., Bowman, E. J., and Altman, S. 1978. Ribonuclease P: An enzyme with an essential RNA component. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**: 3717-3721.

Steitz, J. A., Black, D. L., Gerke, V., Parker, K. A., Krämer, A., Frendewey, D., and Keller, W. 1988. Functions of the abundant U-snRNPs. In *Structure and Function of Major and Minor Small Nuclear Ribonucleoprotein Particles*, ed. Birnstiel, M. L., pp. 115-154. Berlin: Springer-Verlag.

Sullivan, F. X., and Cech, T. R. 1985. Reversibility of cyclization of the *Tetrahymena* rRNA intervening sequence: Implication for the mechanism of splice-site choice. *Cell* **42**: 639-648.

Szostak, J. W. 1986. Enzymatic activity of the conserved core of a group I self-splicing intron. *Nature (London)* **322**: 83-86.

Tabor, S., and Richardson, C. C. 1985. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 1074-1078.

Tinoco, I., Jr., Borer, P. N., Dengler, B., Levine, M. D., Uhlenbeck, O. C., Crothers, D. M., and Gralla, J. 1973. Improved estimation of secondary structure in ribonucleic acids. *Nature New Biol.* **246**: 40-41.

Travers, A. A. 1980. A tRNA^{Tyr} promoter with an altered *in vitro* response to ppGpp. *J. Mol. Biol.* **141**: 91-97.

Turner, D. H., Sugimoto, N., Jaeger, J. A., Longfellow, C. E., Freier, S. M., and Kierzek, R. 1987. Improved parameters for prediction of RNA structure. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **52**: 123-133.

van der Horst, G., and Tabak, H. F. 1985. Self-splicing of yeast mitochondrial ribosomal and messenger RNA precursors. *Cell* **40**: 759-766.

Vioque, A., and Altman, S. 1986. Affinity chromatography with an immobilized RNA enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 5904-5908.

Vold, B., and Green, C. J. 1988. Structural requirements for processing of synthetic tRNA^{His} precursors by the catalytic RNA component of RNase P. *J. Biol. Chem.* **263**: 652-657.

Vournakis, J. N., Celantano, J., Finn, M., Lockard, R. E., Mitra, T., Pavlakis, G., Troutt, A., Vandenberg, M., and Wurst, R. M. 1981. Sequence and structure analysis of end-labeled RNA with nucleases. In *Gene Amplification and Analysis, Vol. II: Analysis of Nucleic Acid Structure by Enzymatic Methods*, ed. Chirikjian, J. G. and Papas, T. S., pp. 268-294. New York: Elsevier North Holland.

- Wild, M. A., and Gall, J. G. 1979. An intervening sequence in the gene coding for 25S ribosomal RNA of *Tetrahymena pigmentosa*. *Cell* **16**: 565-573.
- Wimber, D. E., and Steffensen, D. M. 1970. Localization of 5S RNA genes on *Drosophila* chromosomes by RNA-DNA hybridization. *Science* **170**: 639-641.
- Woese, C. R. 1972. The emergence of genetic organization. In *Exobiology*, ed. Ponnamperna, C., pp. 301-341. Amsterdam: North Holland.
- Woese, C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**: 221-271.
- Woese, C. R., Gutell, R., Gupta, R., and Noller, H. F. 1983. Detailed analysis of the higher-order structure of 16S-like ribosomal ribonucleic acids. *Microbiol. Rev.* **47**: 621-669.
- Wollenzien, P. L., Cantor, C. R., Grant, D. M., and Lambowitz, A. M. 1983. RNA splicing in *Neurospora* mitochondria: Structure of the unspliced 35S precursor ribosomal RNA detected by psoralen cross-linking. *Cell* **32**: 397-407.
- Wurst, R. M., Vournakis, J. N., and Maxam, A. M. 1978. Structure mapping of 5'-³²P-labeled RNA with S1 nuclease. *Biochemistry* **17**: 4493-4499.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains; nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.
- Zaug, A. J., Grabowski, P. J., and Cech, T. R. 1983. Autocatalytic cyclization of an excised intervening sequence RNA is a cleavage-ligation reaction. *Nature (London)* **301**: 578-583.