

Tesis de Posgrado

Utilización de plásmidos quiméricos en estudios de la reparación del daño al ADN en células de mamíferos

Spivak, Graciela

1989

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:

Spivak, Graciela. (1989). Utilización de plásmidos quiméricos en estudios de la reparación del daño al ADN en células de mamíferos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2260_Spivak.pdf

Cita tipo Chicago:

Spivak, Graciela. "Utilización de plásmidos quiméricos en estudios de la reparación del daño al ADN en células de mamíferos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1989. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2260_Spivak.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**UTILIZACIÓN DE PLÁSMIDOS QUIMÉRICOS EN ESTUDIOS DE LA REPARACIÓN DEL
DAÑO AL ADN EN CÉLULAS DE MAMÍFEROS**

AUTOR: Graciela Spivak

DIRECTOR: Philip C. Hanawalt

CODIRECTOR: Héctor N. Torres

LUGAR DE TRABAJO: Departamento de Ciencias Biológicas,

Universidad de Stanford, California, EEUU

**TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR DE LA UNIVERSIDAD DE
BUENOS AIRES**

- 2.260 -
Ej: 2

1989

DEDICATORIA

A la memoria de mi padre, Pini Spivak.

AGRADECIMIENTOS

A mi esposo, Dr. Philip C. Hanawalt, por su apoyo personal y científico; a todos los miembros del laboratorio del Dr. Hanawalt, por sus críticas, consejos, y discusiones; especialmente a la Dra. Ann K. Ganesan, por su paciencia, sus enseñanzas y su estímulo constante, y a los Dres. Jean-Michel Vos y Stephen A. Leadon y a los estudiantes Stephanie Meade y Scott Edwards por sus importantes contribuciones y participación en distintas partes de este proyecto de investigación.

A los Drs. Paul Berg, Dani Canaani, y G. An por los plásmidos pSV2-*gpt*, pSV2-*neo* y pGA293 respectivamente; al Dr. A. P. M. Eker por la enzima fotoreactivante de *S. griseus*; a la Dra. Susan Wallace por la endonucleasa III de *E. coli*; al Dr. B. Howard por los mapas de pSV2-*gpt* y pSV2-*neo*.

A Patricia Seawell y Eliane Wauthier de este laboratorio, por purificar la enzima endonucleasa V de T4; y a Rolando Arrabal y Maria Furneri, sin cuya asistencia técnica nada hubiera sido posible.

A mis hijos, Alex y Lisa Hanawalt, por su amor incondicional, sus risas y sus juegos; a mi madre, Leda S. de Spivak, por su entusiasmo, las numerosas correcciones de mis anglicismos y por las muchas horas de babysitting.

ÍNDICES

Contenido:	Página:
Introducción	9
Materiales y Métodos.	
Cultivo de células	17
Cepas de bacterias y plásmidos	17
Drogas	17
ADN	17
Irradiación a 254 nm	19
Irradiación fotosensibilizada	19
Determinación del contenido de dímeros de pirimidina	19
Sitios apurínicos	22
Glicoles de timina	22
Entrecruzamientos intercatenarios ADN-ADN	23
Fotorreactivación	24
Tratamiento con <i>N</i> -acetoxi-2-acetilaminofluoreno (NA-AAF)	24
Tratamiento con 4'-hidroximetil-4,5',8-trimetilpsoraleno (HMT)	25
Transformación	25
Actividad de la β -galactosidasa	26
Capítulo 1º. Incremento en la transformación de células humanas por plásmidos pSV2 irradiados con luz ultravioleta.	
Introducción	28
Resultados:	
Presencia de ADN "carrier"	30
Presencia de ARN en la preparación del ADN de plásmido	30

Concentración del ADN de plásmido	30
Efecto directo o indirecto de la presencia de lesiones en el plásmido	30
Efecto de la linealización del plásmido	33
Efecto de secuencias deletéreas	36
Capítulo 2º. Identificación de las lesiones que aumentan la actividad transformadora de los plásmidos pSV2 irradiados con UV.	
Introducción	39
Resultados:	
Dímeros de pirimidinas	40
Otros fotoproductos	43
Lesiones secundarias	47
Capítulo 3º. Efecto de la irradiación del ADN sobre la expresión transitoria.	
Introducción	53
Resultados	53
Capítulo 4º. Factores que modifican la estructura del ADN de los plásmidos pSV2.	
Introducción	62
Resultados:	
Efecto del tratamiento de las células receptoras con butirato de sodio:	
Transformación estable	63
Expresión transitoria	63
Efecto de lesiones causadas por agentes químicos:	
<i>N</i> -acetoxi-2-acetilaminofluoreno	65
4'-hidroximetil-4,5',8-trimetilpsoraleno	67
Capítulo 5º. Factores celulares que influyen en la actividad transformadora de los plásmidos pSV2.	
Introducción	72

Resultados:

Efecto de las secuencias homólogas	73
Efecto de la permisividad	76
Conclusión	79
Referencias	88

Figuras:

Figura 1. Esquema de la selección de células XGPR ^{T+}	15
Figura 2. Estructura y mapa de restricción de los plásmidos quiméricos pSV2- <i>gpt</i> y pSV2- <i>neo</i>	16
Figura 3. Efecto de la radiación de 254 nm sobre la actividad transformadora de los plásmidos pSV2	29
Figura 4. Conversión de timinas a dímeros pirimidina-timina en función de la dosis de UV de 254 nm	41
Figura 5. Fotorreactivación de dímeros de pirimidinas en pSV2- <i>gpt</i> irradiado con UV ...	42
Figura 6. Efecto de la UV sobre la sedimentación de pSV2- <i>gpt</i> en gradientes de sacarosa alcalinos	48
Figura 7. Producción de entrecruzamientos intercatenarios en el plásmido pSV2- <i>gpt</i> irradiado con UV de 254 nm	49
Figura 8. Mapas de los plásmidos pSV2- <i>gpt</i> , pGA293 y pZH-1.....	54
Figura 9. Actividad de la β -galactosidasa en función de la concentración de pGA293	56
Figura 10. Actividad de la β -galactosidasa en función del tiempo	57
Figura 11. Efecto de la irradiación sobre la expresión transitoria de la β -galactosidasa ...	58
Figura 12. Efecto de la irradiación sobre la expresión transitoria y la integración estable del plásmido pZH-1	60
Figura 13. Efecto del butirato de sodio sobre la actividad transformadora del plásmido pSV2- <i>gpt</i>	64

Figura 14. Efecto del butirato de sodio sobre la expresión transitoria de <i>lacZ</i> con el pGA293 irradiado o linealizado	66
Figura 15. Efecto del NA-AAF sobre la actividad transformadora del plásmido pSV2- <i>gpt</i>	68
Figura 16. Efecto de HMT y UV cercana sobre la actividad transformadora del plásmido pSV2- <i>gpt</i>	71
Figura 17. Transformación de distintos tipos de células humanas con el plásmido pSV2- <i>gpt</i>	75
Figura 18. Efecto de la irradiación de pSV2- <i>neo</i> sobre la transformación de células de distintas especies	77

Tablas:

Tabla I. Efecto del ADN "carrier" sobre la frecuencia de la transformación con ADN de pSV2- <i>gpt</i>	31
Tabla II. Efecto de la concentración de pSV2- <i>gpt</i> sobre la frecuencia de la transformación	32
Tabla III. Efecto de lesiones en pSV2- <i>neo</i> sobre la frecuencia de la transformación con pSV2- <i>gpt</i>	34
Tabla IV. Efecto de la linealización sobre la actividad transformadora del pSV2- <i>gpt</i>	35
Tabla V. Efecto de secuencias deletéreas sobre la eficiencia de la transformación	37
Tabla VI. Efecto de la irradiación fotosensibilizante sobre la actividad transformadora de pSV2- <i>gpt</i>	44
Tabla VII. Efecto del tratamiento con OsO ₄ sobre la actividad transformadora de pSV2- <i>gpt</i>	46
Tabla VIII. Efecto de los sitiosapurínicos sobre la actividad transformadora del pSV2- <i>gpt</i>	51

Tabla IX. Efecto del tratamiento del pSV2-<i>gpt</i> con la endonucleasa V de T4 sobre su actividad transformadora	52
Tabla X. Efecto del tratamiento con NA-AAF sobre la actividad transformadora del pSV2-<i>gpt</i>	69
Tabla XI. Características de células de distintas especies	74

INTRODUCCIÓN

El genoma de los organismos vivos sufre continuamente alteraciones estructurales espontáneas, o causadas por el medio ambiente, o que están programadas en cada organismo en particular. Las consecuencias de estas alteraciones pueden aparecer como cambios cromosómicos, sean mutaciones, recombinaciones, o amplificaciones.

Si bien estos cambios pueden proveer la variabilidad genética necesaria para la existencia de la evolución, las células de organismos que varían en complejidad desde unicelulares hasta seres humanos poseen la capacidad de reparar el daño al ADN, lo que les permite recuperar actividades esenciales como la síntesis de ADN, ARN y proteínas, asegurando así la integridad de su material genético.

El estudio del daño al ADN y de las respuestas biológicas a dicho daño se ha desarrollado enormemente en los últimos 30 años, especialmente desde que se hizo evidente la relación entre la reparación del daño al ADN y la salud humana.

Los mecanismos desarrollados evolutivamente para reparar o tolerar las lesiones producidas por agentes en el medio ambiente incluyen:

1) la *fotorreactivación*, que requiere luz y actúa exclusivamente sobre los dímeros de pirimidinas, revirtiéndolos a los nucleótidos originales.

2) la *reparación por excisión*, en la que la lesión es reconocida por una endonucleasa específica que corta el ADN (o por una glicosilasa que reconoce las bases alteradas o incorrectas, y corta los enlaces glicosílicos separándolas; luego una endonucleasa corta el ADN en el sitioapurínico o apirimidínico resultante), luego la lesión y varios nucleótidos adyacentes son digeridos por una exonucleasa, una ADN-polimerasa resintetiza el segmento faltante y una ligasa

completa el proceso que resulta en el ADN libre de daño.

3) Cuando la lesión se produce en una región de ADN monocatenario, como por ejemplo en un replicón, el tenedor replicativo puede resultar completamente bloqueado, o puede continuar a través de la lesión (*by-pass*) creando una cadena hija continua, o puede reiniciar a cierta distancia de la lesión, dejando una zona sin duplicar en la cadena hija, opuesta a la lesión; este intervalo no replicado es reparado luego mediante la *reparación post-replicación*. Estos dos mecanismos permiten la recuperación de la célula pero no eliminan el daño; mediante divisiones sucesivas las lesiones son diluidas o reparadas mediante excisión (Hanawalt et al, 1979).

El estudio de los procesos de reparación en bacterias ha avanzado considerablemente gracias a la utilización de mutantes y a la caracterización de las enzimas que actúan en cada etapa; en las células de organismos superiores el análisis resulta más complicado debido a la estructura de la cromatina, a la presencia de replicones múltiples, y a las dificultades que presenta la obtención de mutantes.

El análisis de los complejos mecanismos que las células de eucariontes utilizan para procesar el ADN dañado puede ser realizado más eficientemente mediante la simplificación máxima de los sistemas experimentales utilizados.

Hay varias estrategias que sirven para este propósito:

1) Minimizar el número de distintas clases de lesiones en el ADN mediante el uso de agentes que producen sólo una, o muy pocas, lesiones distintas. La luz ultravioleta (UV), por ejemplo, satisface esta condición ya que forma pocas lesiones, incluyendo los dímeros ciclobutano de pirimidinas, los fotoproductos 6-4 dipirimidinas, y los 5,6-dihidroxi-dihidrotiminas o glicoles de timinas.

2) Reducir el número de procesos celulares que compiten como respuesta al daño. Mediante la utilización de mutantes deficientes en algunos de esos procesos, el investigador

puede caracterizar las actividades que permanecen intactas y evaluar la importancia de las que han sido inactivadas. El número de mutantes de reparación de células humanas es limitado; los que han sido estudiados más exhaustivamente son los de células derivadas de pacientes con xeroderma pigmentosum (XP), una enfermedad hereditaria, autosómica recesiva, que se caracteriza por la extraordinaria sensibilidad de la piel a la luz solar, manifestada por la existencia de carcinomas de piel, y anomalías neurológicas de severidad variable (Bootsma, 1978). Las células de XP son sensibles a la UV, a la aflatoxina B₁, a los psoralenos más luz ultravioleta cercana y al óxido de 4-nitroquinolina. En el caso de XP "clásico", esta sensibilidad parece ser debida a una capacidad reducida de cortar el ADN dañado (reparación por excisión), ya que las células recuperan su resistencia a la UV cuando se les introduce la enzima endonucleasa V de T4, que corta al ADN específicamente en los dímeros de pirimidinas causados por la UV (Smith y Hanawalt, 1978). Las células de pacientes con XP variante poseen un sistema de reparación por excisión normal; Lehmann (1974) propuso que la sensibilidad de estas células a la luz se debe a un sistema de reparación post-replicación defectuoso. Otras enfermedades como la ataxia telangiectasia, la anemia de Fanconi, el síndrome de Bloom, el síndrome de Cockayne y el retinoblastoma hereditario también presentan defectos en los procesos celulares relacionados con la reparación, además de anomalías neurológicas y una mayor incidencia de cánceres (Hanawalt y Sarasin, 1986).

3) Utilizar pequeñas secuencias de ADN, bien definidas, como sondas para estudiar los procesos de reparación en las células humanas. Estas secuencias pueden ser endógenas, como las secuencias repetitivas α en primates, o exógenas, como virus o plásmidos que pueden ser dañados *in vitro*, y luego introducidos en células intactas en las que varios parámetros biológicos pueden ser medidos. Las secuencias exógenas ofrecen varias ventajas, como la posibilidad de introducirles lesiones específicas o en cantidades tales que serían letales para las células.

Varios grupos de investigadores han utilizado estas estrategias para estudiar las respuestas de células derivadas de varias especies de mamíferos, sea mutantes de la reparación o normales,

cuando son infectadas con virus dañados *in vitro*.

Las enzimas de las células huéspedes son capaces de reparar el daño producido en el ADN de los virus por la UV, rayos X y varios agentes químicos; esta reparación, llamada "reactivación en la célula huésped", refleja la sensibilidad de cada tipo de célula a los agentes utilizados (Defais et al, 1983). La utilización de los virus como sondas ofrecen las ventajas detalladas anteriormente, pero también presenta ciertas dificultades, como por ejemplo el número reducido de virus que no codifican sus propias enzimas de duplicación y reparación, y las limitaciones con respecto a los huéspedes disponibles para cada tipo de virus.

Recientes avances y descubrimientos realizados en Biología Molecular, como por ejemplo la caracterización de las enzimas de restricción, permitieron la creación de los plásmidos quiméricos, compuestos por segmentos de ADN que provienen de diversas fuentes, y que pueden expresar información genética en más de una clase de huésped. Estos plásmidos pueden ser propagados en bacterias, por ejemplo *Escherichia coli*, y portan genes procarióticos o eucarióticos organizados de modo tal que pueden ser expresados en células de mamíferos. Células transformadas con plásmidos que contienen genes que confieren resistencia a ciertos inhibidores o antibióticos, pueden ser seleccionadas en cultivo y utilizadas en estudios de procesamiento del ADN de los plásmidos. Los plásmidos, como los virus, son secuencias de ADN relativamente pequeñas, generalmente bien caracterizadas, que pueden ser tratadas con agentes físicos o químicos (*in vitro*) e introducidos en células dañadas o no, de manera que los efectos de los agentes perniciosos sobre el ADN del plásmido pueden ser evaluados independientemente de los efectos en otros componentes celulares.

Una de las ventajas de este sistema es que la selección no depende de que las células recipientes posean mutaciones bioquímicas específicas. Otra ventaja es que los plásmidos no codifican enzimas de reparación del ADN dañado, a menos que hayan sido diseñados con ese propósito. Esto permite el análisis del procesamiento del plásmido dañado en las células

recipientes, sin complicaciones derivadas de funciones codificadas por el plásmido *per se*. Los plásmidos ofrecen la posibilidad de estudiar actividades biológicas bien definidas y específicas, como por ejemplo la síntesis de una enzima cuyo producto puede ser cuantificado fácil y rápidamente. Además, los plásmidos pueden ser utilizados en una gama de huéspedes mucho más amplia que la de los virus (Ganesan y Spivak, 1987).

En este trabajo de tesis se describirá la utilización de los plásmidos quiméricos para estudiar los procesos de reparación del daño al ADN en células humanas. Los plásmidos serán tratados con distintos agentes físicos o químicos *in vitro*, y luego introducidos en células humanas mediante la coprecipitación con fosfato de calcio. La eficiencia de la transformación de las células recipientes, medida a través de la expresión a corto plazo de genes en el plásmido, o de la transformación estable que permite a las células transformadas crecer en medio selectivo, dará una idea de la capacidad de las células de procesar el daño en los plásmidos.

Los plásmidos que serán utilizados en este trabajo incluyen el pSV2-*gpt*, el pSV2-*neo*, y otros plásmidos derivados del pSV2-*gpt* que serán descritos en las secciones correspondientes. El plásmido quimérico pSV2-*gpt* contiene el gen *gpt* de *Escherichia coli*, que codifica la enzima fosforibosiltransferasa de la xantina y guanina (Mulligan y Berg, 1980, 1981a, 1981b). Los fragmentos adyacentes al gen *gpt* provienen del virus SV40 e incluyen el promotor temprano de la transcripción y secuencias que permiten el empalme y la poliadenilación del gen *gpt*, de manera que éste puede ser transcrito en células de mamíferos. La fosforibosiltransferasa de la xantina y guanina bacteriana (XGPRT) puede utilizar xantina como sustrato más eficientemente que la fosforibosiltransferasa de la hipoxantina y guanina de mamíferos (HGPRT). Las células que expresan el gen *gpt* pueden ser seleccionadas gracias a su capacidad de crecer en medio de cultivo que contiene ácido micofenólico, que inhibe específicamente la enzima que convierte la inosina monofosfato (IMP) en xantina monofosfato (XMP), y aminopterina, que inhibe la síntesis de purinas a partir de sus precursores; además contiene xantina, hipoxantina y timidina

(Mulligan y Berg, 1981a; Figura 1). Además de secuencias de *E. coli* y de SV40, el pSV2-*gpt* contiene secuencias del plásmido bacteriano pBR322, incluyendo un origen de replicación bacteriano y el gen de la β -lactamasa que confiere resistencia a la ampicilina (Figura 2). El plásmido pSV2-*neo* descrito por Southern y Berg (1982) posee las mismas características que pSV2-*gpt* excepto que en lugar de *gpt* contiene el gen *neo*, proveniente del transposón Tn5, que codifica una fosfotransferasa, la APH(3')II. Esta enzima confiere resistencia al antibiótico G418. El pSV2-*neo* que se utilizó en estos estudios (Figura 2) fue construido a partir del plásmido pML-1 en lugar del pBR322 (D. Canaani, comunicación personal). El pML-1 fue derivado mediante la delección de un fragmento de alrededor de 1,4 kb cerca del origen de replicación del pBR322 (Lusky y Botchan, 1981).

Figura 1. Esquema de la selección de células XGPRT⁺. La presencia en el medio de cultivo de los inhibidores de la síntesis *de novo*, aminopterina (AM) y ácido micofenólico (MPA), obliga a las células a utilizar purinas para sintetizar nucleósidos monofosfato. Sólo las células que poseen el gen que codifica la XGPRT de *E. coli* son capaces de utilizar xantina (X) para sintetizar XMP.

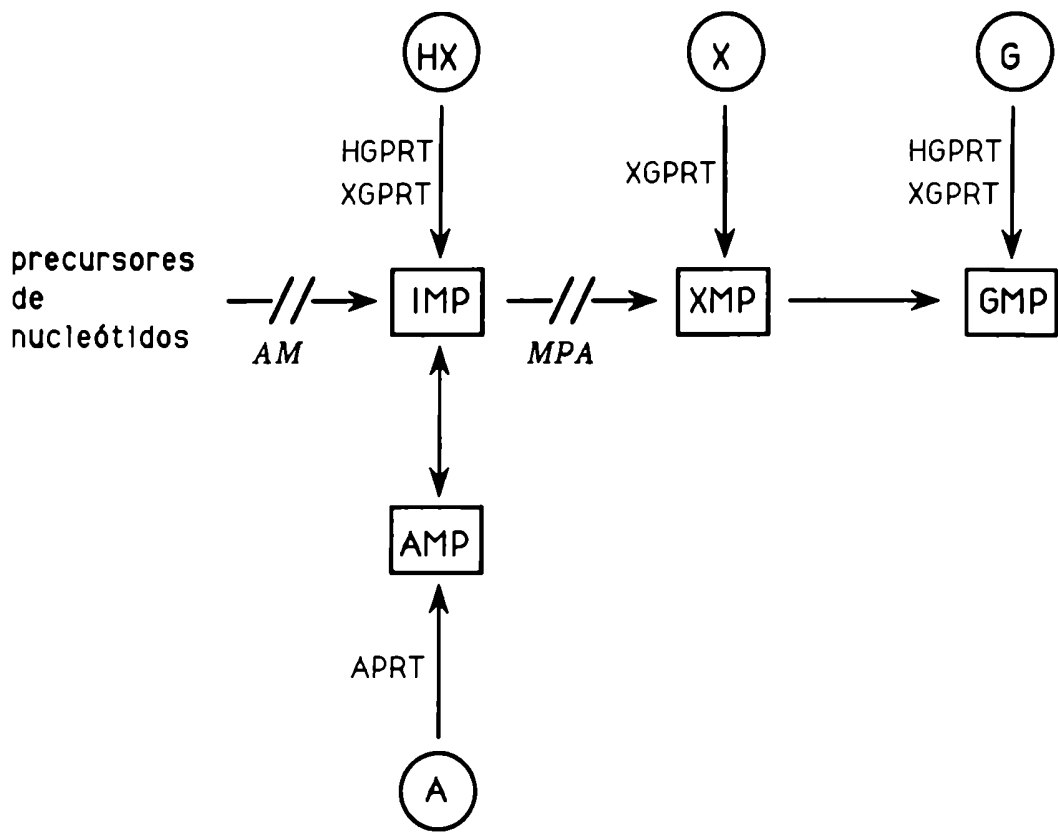
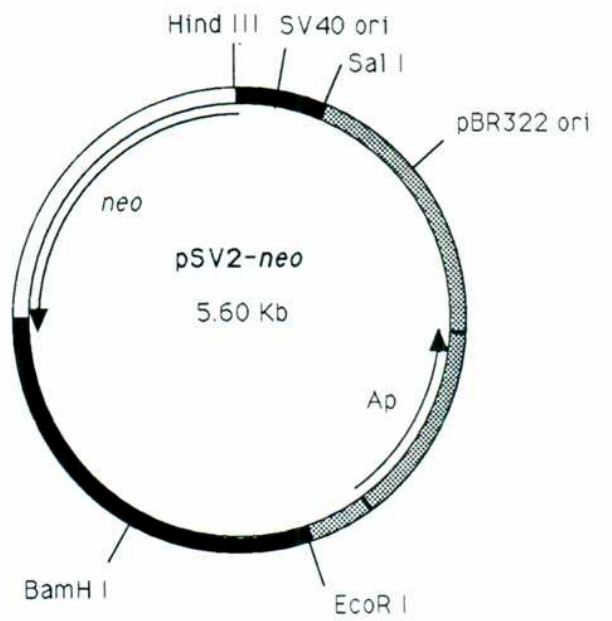
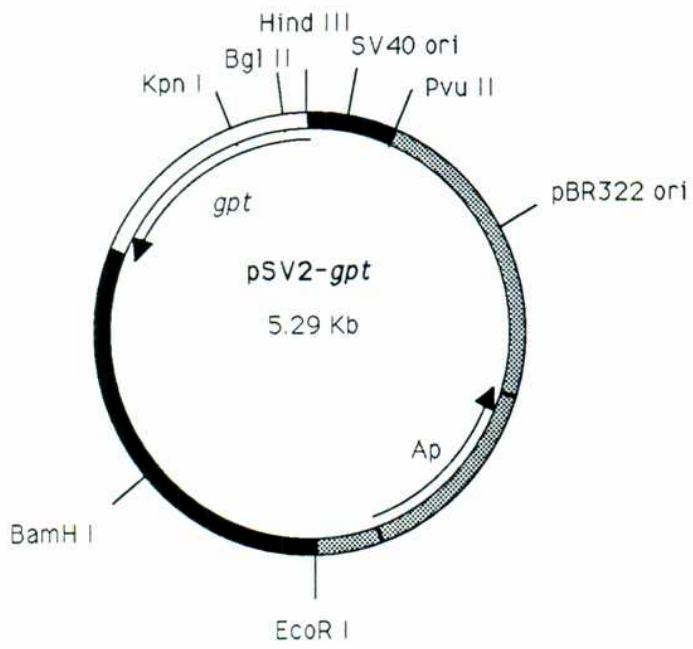


Figura 2. Estructura y mapa de restricción de los plásmidos quiméricos pSV2-*gpt* y pSV2-*neo*. Las regiones sombreadas indican secuencias de pBR322 en pSV2-*gpt* o de pML-1 en pSV2-*neo* (2.3 kbp); las regiones negras, secuencias de SV40 (1.9 kbp); las regiones blancas, los genes *gpt* de *E. coli* (1.0 kbp) o *neo* de Tn5 (1.4 kbp). Los sitios de restricción fueron tomados de datos publicados o de las secuencias provistas amablemente por el Dr. B. Howard. ori: origen de replicación.



MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de células.

Las líneas celulares utilizadas están descritas en la Tabla XI. El medio de cultivo utilizado fue el medio mínimo esencial de Eagle con sales de Earle (GIBCO) complementado con 10 % de suero fetal bovino, 2 mM glutamina, y solución antibiótica-antimicótica (GIBCO).

Cepas de bacterias y plásmidos.

Los plásmidos pSV2-*gpt*, pSV2-*gpt*Δ(*Hind*III-*Bgl*I) y pSV2-*neo* fueron obtenidos del laboratorio del Dr. P. Berg de la Universidad de Stanford. La cepa HB101 de *Escherichia coli* es el huésped original; para obtener plásmidos marcados con radioactividad, se utilizó la cepa dependiente de timina AB2487, derivada de AB2463 (Bachmann, 1972).

Drogas.

El ácido micofenólico fue un obsequio de la compañía Eli Lilly, o fue comprado a Calbiochem. El antibiótico G418 (o geneticina) fue de GIBCO, el butirato de sodio de SIGMA (B5887) y el HMT de HRI Associates. El [³H]NA-AAF (432.5 Ci/mol) fue obtenido del Cancer Research Program del National Cancer Institute, Division of Cancer Cause and Prevention, Bethesda, Maryland, USA, y la [Metil³H]timina (60 Ci/mmol) fue adquirida en New England Nuclear o Amersham. La [2-¹⁴C]timina (55.5 Ci/mmol) fue de New England Nuclear, y el [α-³²P]dATP (3.000 Ci/mmol) de Amersham.

ADN.

Los plásmidos radioactivos fueron amplificados y obtenidos de la cepa AB2487, mientras que los plásmidos no radioactivos fueron obtenidos de la cepa HB101 usando en ambos casos el mismo método de preparación (Seawell y Ganesan, 1981). En resumen, las células fueron

propagadas a 37°C con agitación en caldo mínimo de Davis conteniendo glucosa 0.4 %, hidrolisado de caseína sin vitaminas 0.05 %, vitamina B₁ 0.5 µg/ml y ampicilina 30 µg/ml. En el caso de la cepa AB2487, se agregó timina 0.08 µM o una mezcla de timina radioactiva (2 µCi/ml de [2-¹⁴C]timina o 10 µCi/ml de [Metil³H]timina) y timina no-radioactiva para alcanzar una concentración final de 0.032 µM. Cuando el cultivo adquirió una densidad óptica de 2.0 a 650 nm, se le agregó cloramfenicol 150 µg/ml concentración final y se continuó la incubación durante 16-20 hr más. El cultivo fue enfriado y centrifugado a 4°C, el pellet lavado con buffer TE (Tris 10 mM, pH 7, EDTA 1 mM) y resuspendido en 2.5 ml de Tris-HCl 50 mM, pH 8, conteniendo sacarosa 25 %. Luego de ello, se agregó 0.5 ml de lisozima 10 mg/ml recién preparada, y se incubó 5 min en hielo. Entonces, se agregó 4 ml Brij-58 1 %, deoxicolato de sodio 0.4 %, EDTA 63 mM, Tris-HCl 50 mM pH 8. El lisado fue centrifugado a 30.000 rpm durante 30 min a 16°C. El sobrenadante fue diluido con buffer TE para obtener un volumen de 8 ml, sometido a agitación en un Vortex durante 60 seg, mezclado con 8 g CsCl y 0.9 ml bromuro de etidio 10 mg/ml y centrifugado a 37.000 rpm durante 36 hr a 20°C. La banda de ADN superhelicoidal, que es visible cuando se la ilumina con luz ultravioleta, fue extraída con una jeringa. El bromuro de etidio fue extraído mediante 4 lavados con isopropanol 50 % en solución saturada de CsCl en Tris 50 mM 50 %, y el ADN fue dialisado contra Tris-HCl 10 mM pH 8, NaCl 100 mM y luego contra buffer NT (NaCl 10 mM, Tris-HCl 1 mM, pH 8).

La concentración del ADN fue determinada con el colorante Hoescht 33258 (Brunk et al, 1979; Cesarone et al, 1979). El plásmido lineal fue preparado mediante la digestión del plásmido superhelicoidal con *EcoRI* (New England Biolabs), *KpnI* (BRL) o *PvuII* (BRL) siguiendo las instrucciones del proveedor respectivo. El ADN lineal y los fragmentos de restricción fueron purificados mediante electroforesis en geles de 1 % agarosa y electroelución. El ADN carrier fue purificado de cultivos de células receptoras mediante el procedimiento descrito por Hughes et al (1978): las células fueron tripsinizadas, centrifugadas, lavadas dos veces con NaCl 140 mM, KCl 5 mM, glucosa 5.5 mM, Tris 25 mM pH 7.4 y resuspendidas en

STE (NaCl 100 mM, Tris 20 mM pH 7.4, EDTA 10 mM). Se agregó dodecilsulfato de sodio (concentración final 0.5 %), pronasa (precalentada a 37°C durante 120 min, concentración final 0.5 mg/ml) y RNasa A pancreática (precalentada a 100°C durante 10 min, concentración final 0.1 mg/ml) y el lisado fue incubado a 25°C durante 24 hr. Luego el ADN fue extraído con un volumen igual de fenol : cloroformo : alcohol isoamílico (25:24:1) dos veces. La fase acuosa fue dialisada extensivamente contra buffer NT.

Irradiación a 254 nm.

El ADN del plásmido en solución en unos 200 μ l de buffer NT fue colocado en una placa de Petri; las irradiaciones fueron llevadas a cabo mientras cada muestra era agitada suavemente sobre una plataforma rotatoria (Eberbach Co.) para asegurar que el ADN fuera irradiado uniformemente. La lámpara germicida utilizada (General Electric G15T8, 15 Watts) emitió 0.75 J/m²/segundo a una distancia de 63 cm. La dosis fue medida con un fotómetro germicida IL254 (International Light).

Irradiación fotosensibilizada.

ADN del plásmido fue irradiado en buffer sensibilizante (buffer de fosfato de sodio 10 mM pH 7.8, con acetofenona 3 mM y NO₃Ag 10 μ M; Rahn, 1983). La acetofenona fue diluida en etanol 95 % justo antes de agregarla al buffer. El ADN fue colocado en una cubeta de cuarzo que fue cubierta con Parafilm y gaseado con nitrógeno mediante burbujeo a través de un tubo capilar durante 15 min previos a la irradiación y durante la irradiación con una lámpara de mercurio de alta presión (Universal Light Source). La luz fue filtrada a través de un filtro absorbente de calor (Rolyn Optics) y un filtro de interferencia con transmisión máxima a 313 nm (Ealing Corp.).

Determinación del contenido de dímeros de pirimidina.

Se utilizaron distintos métodos:

(a) cromatografía en capa delgada en una dimensión (Reynolds et al, 1980). El ADN del plásmido marcado con [Metil³H]timina fue disuelto en 0.2 ml de ácido fórmico 98 %, sellado en tubos de ignición (Corning) e hidrolisado a 180°C durante 45 min; la muestra fue desecada, resuspendida en 10 μ l de agua y aplicada sobre una placa de silica gel G/UV₂₅₄ (Brinkmann Instruments) de a un μ l por vez. Los cromatogramas fueron desarrollados a temperatura ambiente con 100 ml de solvente [la fase orgánica formada al mezclar acetato de etilo : n-propanol : agua (4:1:2)] hasta que éste hubo ascendido 10 cm. Los carriles que contenían las muestras fueron cubiertas con cinta autoadhesiva transparente, las fracciones de 0.5 cm fueron marcadas con lápiz, recortadas y separando la cinta adhesiva de cada porción de placa, colocadas (ambas cinta y placa) en viales. Cada fracción fue disuelta en 1 ml de agua y mezclada con 10 ml de líquido de centelleo para determinar la radioactividad respectiva. El número de dímeros fue calculado en base al porcentaje de los mismos en la muestra.

(b) análisis en gradientes de sacarosa alcalinos. Los plásmidos marcados con [Metil³H]timina fueron linealizados con *Eco RI*, irradiados y digeridos con la endonucleasa V de T4, una enzima específica para los dímeros de timina (Friedberg, 1972; Umlas et al, 1985). A cada muestra se le agregó 10 N NaOH para obtener una concentración de 0.5 N. Luego de 5 min las muestras fueron aplicadas sobre gradientes lineales preformados de sacarosa 5-20 %, NaCl 0.7 M, NaOH 0.3 N, EDTA 1 mM y centrifugadas durante 5 hr a 45.000 rpm a 20°C. 30 fracciones de 10 gotas cada una fueron recolectadas en tiras de papel Whatman N° 17, que fueron lavadas con ácido tricloroacético (TCA) 5 % durante 10 min, etanol 95 % durante 10 min y acetona durante 2 min, y luego secadas bajo una luz infraroja. La radioactividad de cada fracción fue determinada, y el número de incisiones por molécula de plásmido fue calculado comparando el peso molecular promedio (M_n) del ADN digerido con la endonucleasa V con el del plásmido lineal no tratado (Sarasín y Hanawalt, 1980).

(c) insición del plásmido superhelicoidal con la endonucleasa V de T4 y análisis mediante

electroforesis en geles de agarosa a pH neutro. Para las dosis de UV que producen hasta 3 sitios sensibles a la endonucleasa V por molécula del plásmido, se utilizó la fórmula de Poisson para calcular el promedio de dímeros por molécula de ADN (x), a partir de la fracción de moléculas resistentes a la endonucleasa (e^{-x}), que permanecen superhelicoidales (forma I), mientras que las moléculas con una o más incisiones son convertidas en círculos abiertos (forma II) que poseen una movilidad electroforética distinta. El ADN radioactivo fue sometido a electroforesis en geles de agarosa 1 % en buffer Tris-acetato (Tris-acetato 0.04 M, EDTA 2 mM; Maniatis et al., 1982) a 100 V. Luego de teñir el ADN con bromuro de etidio 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, las bandas de las formas I y II del plásmido fueron visualizadas con luz UV, cortadas del gel, colocadas en viales, disueltas en 0.1 ml HCl 1 N a 100°C durante el tiempo suficiente para fundir la agarosa, mezcladas con 3 ml de Instagel (Packard) y la radioactividad de cada fracción fue determinada en un contador de centelleo líquido (Seawell y Ganesan, 1981).

Para las dosis que producen entre 5 y 20 sitios por molécula, el contenido de dímeros fue calculado a partir de la fracción de moléculas superhelicoidales convertidas a la forma lineal (forma III) por la endonucleasa V. Estas moléculas lineales resultan cuando 2 ó más incisiones ocurren muy próximas entre sí y opuestas, en ambas cadenas complementarias del ADN bicatenario (Lam y Reynolds, 1986a, b). El número de cortes bicatenarios (x) fue calculado sobre la base de la fracción de moléculas de plásmido convertidas a la forma III ($x \cdot e^{-x}$). Se construyó una curva de calibración comparando el número de cortes bicatenarios producidos por la endonucleasa V, con el contenido de dímeros de pirimidina, calculado mediante el método cromatográfico descrito previamente en (a), en las mismas muestras. Esta curva fue utilizada para estimar el número de dímeros en otras muestras de plásmidos irradiados y analizado en geles. Por ejemplo, cuando el pSV2-*gpt* fue irradiado con UV de 313 nm en condiciones fotosensibilizantes, 22 incisiones por la endonucleasa, que resultaron en -1 corte bicatenario por molécula, equivalieron a la conversión del 37 % del ADN a la forma lineal.

Las 3 formas del ADN del plásmido (superhelicoidal, círculos relajados o lineal; formas I, II y III respectivamente) fueron separadas mediante electroforesis en geles de agarosa 1 % en buffer Tris-acetato. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y fotografiados. La cantidad de ADN en cada banda fue determinada densitométricamente directamente en las fotografías, con un densitómetro Quick Scan R and D (Helena Laboratories). Se utilizó un factor de 1.4 para corregir la diferencia en afinidad del bromuro de etidio por el ADN superhelicoidal o relajado, respectivamente (Lloyd et al, 1978).

Sitios apurínicos.

El ADN radioactivo de plásmidos en buffer de citrato de sodio 10 mM pH 4, NaCl 100 mM, fue expuesto a una temperatura de 60°C durante diferentes tiempos (Lindahl, 1980). Para determinar el número de sitios apurínicos creados, el ADN fue analizado en gradientes de sacarosa alcalinos como los que han sido descritos previamente, o tratado con la endonucleasa III de *E. coli* en EtSH (β -mercaptoetanol) 1.3 mM, Tris 10 mM pH 7.5, EDTA 1 mM, KCl 0.1 M. Las reacciones fueron incubadas a 37°C durante 10 min, detenidas con 0.3 volúmenes de dodecilsulfato de sodio 5 %, glicerol 30 %, EDTA 0.1 M y azul de bromofenol 0.05 % y analizado en geles de agarosa neutros como los previamente descritos para dímeros de pirimidinas (Katcher y Wallace, 1983). El número de incisiones fue calculado sobre la base de la fórmula de Poisson.

Glicoles de timina.

El plásmido superhelicoidal en buffer TE fue incubado a 65°C durante 2-4 min, tratado con OsO_4 (0.01-1.00 %) durante 5 min a 65°C, y dejado enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente (modificado de Katcher y Wallace, 1983). El exceso de OsO_4 fue eliminado mediante una diálisis prolongada contra buffer TE. El número de lesiones fue determinado mediante el tratamiento con la endonucleasa III de *E. coli* como ha sido descrito para sitios apurínicos, o mediante el método de ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a una enzima), utilizando un

anticuerpo monoclonal contra glicoles de timina en ADN. Las placas de microtitración (Dynatech) fueron incubadas con 20 μg de sulfato de protamina en cada cavidad durante 90 min a temperatura ambiente. Se adsorbieron 0.05 μg de ADN tratado o no con OsO_4 , en 0.05 ml de buffer de fosfato salino (PBS, NaCl 160 mg/ml, KCl 4 mg/ml, Na_2HPO_4 18.3 mg/ml, KH_2PO_4 4 mg/ml) a 37°C durante 16 hr. Las placas fueron lavadas 3 veces con Tween 20 0.05 %, suero de caballo inactivado al calor 1 % en PBS (PBS-T-Hs), e incubadas con PBS con 1 % suero de caballo inactivado, durante 4 hr a temperatura ambiente. Luego de 3 lavados con PBS-T-Hs, 0.1 ml de fluido ascítico o sobrenadante de células productoras del anticuerpo monoclonal anti-glicoles de timina fueron agregados a cada cavidad, y las placas fueron incubadas a 37°C durante 90 min. Luego de 3 lavados con PBS-T-Hs, las placas fueron incubadas a 37°C durante 90 min con 0.1 ml de fosfatasa alcalina conjugada a la IgG anti-ratón de conejo en cada cavidad. Luego de 3 lavados con PBS-T-Hs, se agregaron 0.2 ml de *p*-nitrofenilfosfato 1 mg/ml en glicina 100mM, MgCl_2 1 mM, ZnCl_2 1 mM, pH 10.4. Luego de una incubación a 37°C durante 1-2 hr, el *p*-nitrofenol producido fue medido mediante su absorción a 405 nm (Leadon y Hanawalt, 1983).

Entrecruzamientos intercatenarios ADN-ADN.

El ADN plasmídico fue linealizado con *EcoRI*, irradiado o no, marcado con $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ en los extremos mediante una reacción que contenía 2 μl de buffer de transcripción (Tris 0.5 M pH 7.2, MgSO_4 0.1 M, ditiotreitól 1 mM, albúmina de suero bovina 0.5 mg/ml), 1 μg de ADN, 2 μCi de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ y una unidad del fragmento Klenow de la ADN-polimerasa de *E. coli* en un volumen de 25 μl . Se incubó a temperatura ambiente durante 10 min, y se detuvo la reacción con 1 μl EDTA 0.5 M (Maniatis et al, 1982). El ADN fue desnaturalizado con NaOH 0.2 M durante 10 min y sometido a electroforesis en geles de agarosa neutros. Los geles fueron desecados al vacío y expuestos a películas de rayos X. Las fracciones del ADN que migraban como cadenas mono- o bicatenarias, respectivamente, fueron cuantificadas mediante densitometría de las radiografías y mediante la radioactividad presente en las regiones

respectivas extraídas de los geles (Vos, 1988). El número de entrecruzamientos por molécula de plásmido (x) fue calculado sobre la base de la fracción de las moléculas que permanecieron monocatenarias (e^{-x}).

Fotorreactivación.

La enzima fotorreactivante de *Streptomyces griseus* fue diluida 1:5 en fosfato de potasio 10 mM pH 7, albúmina de suero bovina 1 mg/ml, β -mercaptoetanol 5 mM y NaCl 40 mM (Eker y Fichtinger-Schepman, 1975). La enzima diluida fue combinada con un volumen igual de ADN en fosfato de potasio 10 mM pH 7, NaCl 10 mM (Eker, 1980), colocada en una placa de Petri, cubierta con un vidrio común de ventana para filtrar la luz de < 360 nm, e iluminada con una lámpara de luz blanca fría (Sylvania F15T8) durante 45 min. Para prevenir la fotorreactivación por las luces ambientales, las reacciones se llevaron a cabo en laboratorios provistos con luces amarillas.

Tratamiento con *N*-acetoxi-2-aminofluoreno (NA-AAF).

El plásmido linealizado fue tratado con [3 H]NA-AAF durante 20 min a 37 C°. La droga no aducida fue eliminada mediante tres extracciones con un volumen de cloroformo, seguidas por tres extracciones con tres volúmenes de éter. Los aductos en el ADN fueron identificados mediante la cromatografía líquida de alta presión: el ADN fue mezclado con marcadores sintéticos (provistos por el Dr. F. Beland) y luego desecado bajo una corriente de N₂. Se le agregó TCA anhidro y fue incubado a 70°C durante 30 min y evaporado bajo N₂. La muestra fue disuelta en metanol 20 % y analizada utilizando una columna μ Bondapak C₁₈ (Waters) en un sistema de cromatografía de gradiente líquido Beckman modelo 322 equipado con un monitor de UV. Los aductos fueron separados en un gradiente convexo de 20 a 56 % de metanol en agua durante 30 min, seguido de un gradiente lineal hasta obtener metanol 100 % en 2 min. Las fracciones fueron recolectadas a una velocidad de 2 ml/min, y la radioactividad determinada mediante centelleo líquido. La posición de los marcadores sintéticos fue determinada mediante

su absorción ultravioleta característica (Leadon y Hanawalt, 1984). La frecuencia de aductos en cada experimento fue determinada mediante la radioactividad ligada al ADN en cada caso.

Tratamiento con 4'-hidroximetil-4,5',8-trimetilpsoraleno (HMT).

Las mezclas de HMT tritiado (13.2 Ci/mM) y sin marcar en concentraciones de 0.3 a 100.0 $\mu\text{g/ml}$ fueron añadidas a 200 μl de buffer TE que contenía 5 μg de pSV2-*gpt* linealizado con *EcoRI*. Las alícuotas fueron colocadas en miniplacas e irradiadas con luz UV cercana emitida por lámparas de luz azul-negra (General Electric F15T8-BLB, 18 Watts) con una fluencia de 1.200 J/m^2 por min. El HMT que no formó aductos fue eliminado mediante cuatro extracciones con cloroformo, seguidas por una precipitación con etanol. El ADN fue resuspendido en 200 μl de buffer TE; una fracción de cada muestra fue re-irradiada con UV cercana durante 60 min. En cada muestra, el número total de aductos fue calculado a partir de la radioactividad ligada al ADN; el número de entrecruzamientos fue determinado en geles de agarosa como fue descrito para los causados con UV de 254 nm.

Transformación.

Las células receptoras fueron sembradas en placas de cultivo de 10 cm de diámetro (10^6 células per placa) y transformadas 24 horas después mediante la coprecipitación con fosfato de calcio: al ADN a ser introducido se le agregó primero CaCl_2 2 M para obtener una concentración de 0.25 M, y luego 1 volumen igual de 2 x HBS (NaCl 274 mM, KCl 10 mM, Na_2HPO_4 1.4 mM, dextrosa 12 mM, HEPES 42 mM pH 7). La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 20 min; se aspiró el medio de cultivo de las placas, se agregó 1 ml de coprecipitado, y luego de 20 min se agregó 10 ml de medio de cultivo y se incubaron a 37°C (Graham y van der Eb, 1976). 4 horas más tarde recibieron un tratamiento con glicerol: se aspiró el medio de cultivo de las placas, se agregó 2 ml de glicerol 15 % en HBS, que se aspiró luego de 3 min. Se enjuagaron las placas con 5 ml de medio de cultivo y se incubaron con 10 ml de medio de cultivo (Parker y Stark, 1979). Después de 3 días de incubación en el medio de

rutina, las células fueron tripsinizadas y sembradas en medio selectivo: 5×10^6 células/placa en un medio que contenía, además de suero, antibióticos y glutamina, xantina 0.25 mg/ml, ácido micofenólico 25 μ g/ml, aminopterina 2 μ g/ml, hipoxantina 15 μ g/ml, y timidina 10 μ g/ml, (Mulligan y Berg 1981a) para seleccionar a favor del fenotipo Gpt⁺, o 2×10^6 células/placa en un medio con 400 μ g/ml G418 (GIBCO) para seleccionar células Neo⁺. El medio fue renovado cada 3-4 días hasta que las colonias fueron visibles (10-20 días). Las placas fueron lavadas con NaCl 0.9 % y teñidas con azul de metileno 1 %. La frecuencia de la transformación se expresó como el número de colonias transformadas por células sembradas originalmente.

Actividad de la β -galactosidasa.

Las células fueron tripsinizadas, resuspendidas en un medio de cultivo y centrifugadas durante 10 min en una centrifuga clínica; el pellet fue resuspendido en 2 ml de buffer Z (Na₂HPO₄ 60 mM, NaH₂PO₄.H₂O 40 mM, KCl 10mM, MgSO₄.7H₂O 1 mM; Miller, 1972), centrifugadas y resuspendidas en 1 ml de buffer Z. La concentración celular fue determinada y las células fueron congeladas a -80 °C o procesadas de inmediato de acuerdo al siguiente procedimiento. A cada tubo conteniendo 1 ml de células, o 1 ml de buffer Z para las reacciones en blanco, se le agregó 0.05 ml de sarkosil 10%. Las reacciones fueron incubadas a 37°C durante 5 min. Luego se agregó 0.2 ml de *o*-nitrofenol 4 mg/ml en buffer de fosfato de sodio 0.1 M, pH 6.8; cada tubo fue tapado, agitado rápidamente e incubado a 37°C. La duración de la incubación varió entre experimentos y dependiendo de cuánto tiempo llevó para que la reacción tomara color amarillo; en ese momento se detuvo mediante el agregado de 0.5 ml de Na₂CO₃. Una reacción en blanco fue detenida al mismo tiempo para compensar por la degradación espontánea del *o*-nitrofenol. La absorbancia a 420 nm fue determinada de inmediato, o bien las muestras fueron mantenidas en hielo. La actividad de la enzima se calculó a partir de la fórmula:

$$\frac{A \times V}{T \times C \times N \times 4.5 \times 10^{-6}} = \text{pmoles de ONPG / min / célula}$$

en la que A = absorbancia a 420 nm de la reacción - la de un blanco;

V = volumen final de la reacción (ml);

T = tiempo de la reacción (min);

C = volumen de células (ml);

N = número de células por ml;

4.5×10^{-6} = absorbancia a 420 nm de 1 pmol/ml de ONPG.

CAPITULO 1^a

INCREMENTO EN LA TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS HUMANAS POR PLÁSMIDOS pSV2 IRRADIADOS CON LUZ ULTRAVIOLETA

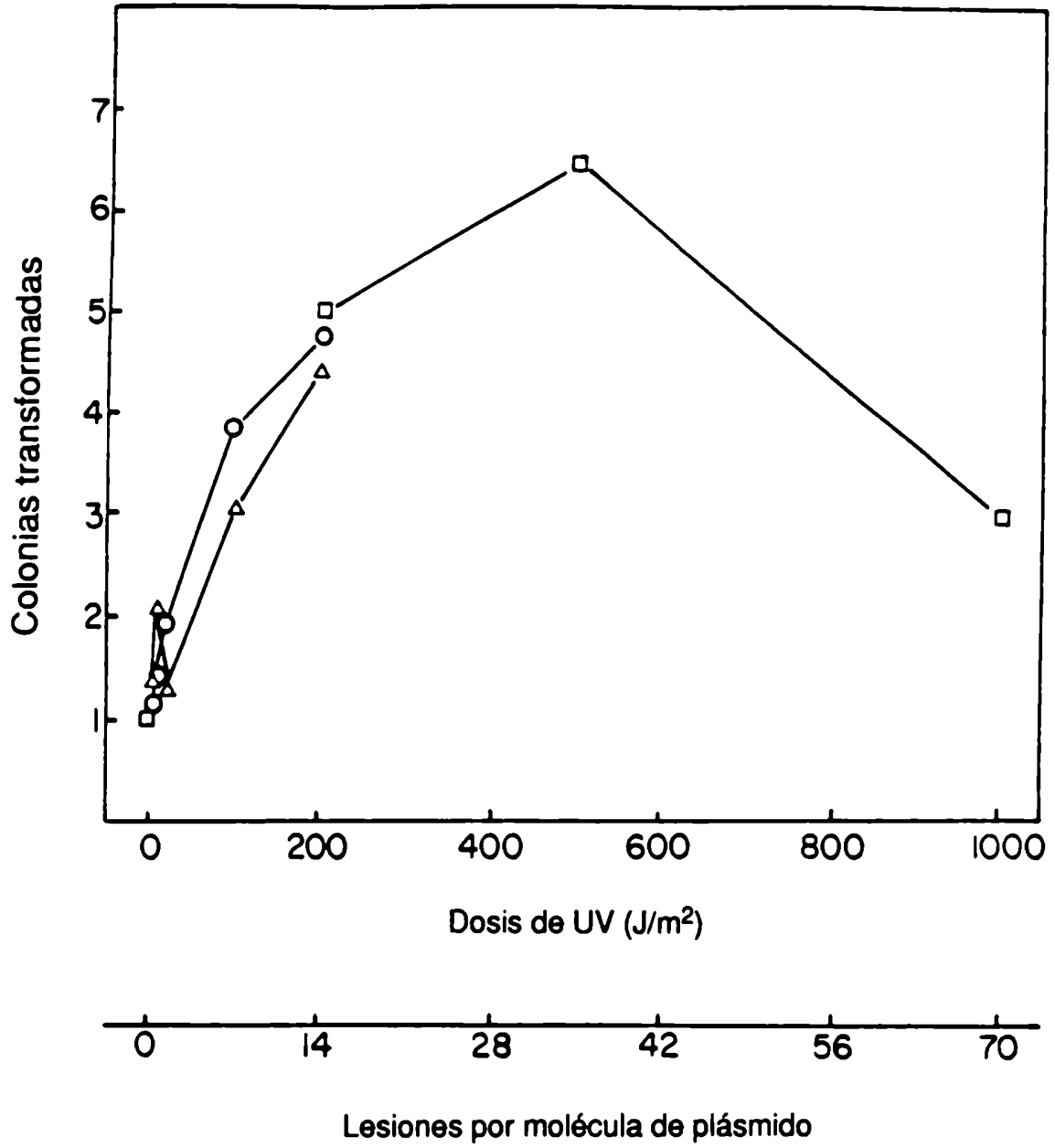
Introducción

Con el propósito de estudiar la acción de las enzimas de reparación humanas sobre el ADN de los plásmidos pSV2-*gpt* dañados, se irradió dicho ADN con luz ultravioleta (UV) y se lo introdujo en células humanas utilizando una modificación de la técnica de coprecipitación con fosfato de calcio (Graham y van der Eb, 1973; Parker y Stark, 1979). En estos experimentos se emplearon células normales y también células con un sistema de reparación defectuoso, derivadas de pacientes con xeroderma pigmentosum grupo A (XP-A). Se observó que los plásmidos irradiados con dosis entre 150 y 200 J/m² a una longitud de onda de 254 nm produjeron más colonias de células con un fenotipo Gpt⁺ que los plásmidos controles no irradiados, en ambos tipos de células, independientemente de su capacidad de reparar lesiones causadas por la irradiación. Las dosis de UV mayores que 1.000 J/m² redujeron la actividad transformadora del plásmido. En este capítulo se presentan los resultados de experimentos que documentan este fenómeno, y la evaluación de algunas de las explicaciones posibles.

Resultados

La irradiación del ADN de pSV2-*gpt* con UV antes de introducirlo en las las células receptoras modificó el rendimiento de células transformadas. Las dosis de UV de hasta alrededor de 500 J/m² causaron un incremento en la frecuencia de la transformación que resultó ser proporcional a la dosis (Figura 3). Este incremento fue observado en todos los experimentos llevados a cabo; generalmente se observó un incremento entre 2 y 5 veces, que en ocasiones llegó a ser de 10 a 20 veces.

Figura 3. Efecto de la radiación de 254 nm sobre la actividad transformadora de los plásmidos pSV2. Los plásmidos pSV2-*gpt* (círculos, triángulos) o pSV2-*neo* (cuadrados) fueron irradiados con UV y luego introducidos en las células humanas HT-1080 (círculos, cuadrados) y XP12RO-SV40 (triángulos) mediante la coprecipitación con fosfato de calcio. Las frecuencias de transformación Gpt⁺ y Neo⁺ fueron normalizadas con respecto a las obtenidas con ADN no irradiado. La incidencia de dímeros de pirimidinas fue calculada en los plásmidos irradiados con dosis < de 50 J/m² sobre la base del número de incisiones producidas por la endonucleasa V de T4 y el análisis en geles de agarosa neutros; para las dosis > de 50 J/m² fue extrapolada.



Se investigaron distintas posibilidades que podrían explicar el incremento en la frecuencia de la transformación que resulta cuando el plásmido es irradiado con bajas dosis de UV.

Presencia de ADN "carrier".

Cuando el ADN "carrier", es decir el ADN purificado de las células receptoras, fue mezclado con ADN de pSV2-*gpt* en la coprecipitación con fosfato de calcio, la frecuencia en la transformación aumentó 2 veces, tanto si el plásmido había sido irradiado como si no; quiere decir que la diferencia entre la transformación obtenida con plásmido irradiado o no, se mantuvo independientemente de la presencia o ausencia de ADN "carrier" (Tabla I). Como consecuencia, en los experimentos subsiguientes se omitió el agregado del ADN "carrier".

Presencia de ARN en la preparación del ADN de plásmido.

El ADN de pSV2-*gpt* tratado para eliminar contaminaciones por ARN bacteriano o ribonucleótidos (Blair et al, 1972) se comportó como el ADN no tratado. Esto indica que la acción de la radiación UV sobre la eficiencia de la transformación no depende de la presencia de dichos contaminantes en la preparación del ADN plasmídico (datos no mostrados).

Concentración del ADN de plásmido.

La concentración del ADN de plásmido utilizado en transformaciones fue variada entre 0.05 y 10 $\mu\text{g/placa}$. El número de colonias de células transformadas aumentó en forma proporcional con la cantidad de plásmido introducido en las células, pero la relación entre el número obtenido con plásmido irradiado o no, se mantuvo casi constante (Tabla II).

Efecto directo o indirecto de la presencia de lesiones en el plásmido.

Para determinar si el aumento en la frecuencia de la transformación observada con el plásmido irradiado se debía a un efecto directo de las lesiones del ADN o alternativamente si

TABLA I

Efecto de ADN "carrier" sobre la frecuencia de la transformación con ADN de pSV2-*gpt*.

UV	COLONIAS G_{pt}^+ /10 ⁵ CÉLULAS RECEPTORAS				
	A	+/-	B	+/-	B/A
	6		12		2.0
	23	3.8	50	4.2	2.2

El ADN de pSV2-*gpt* (1.2 μ g/placa) irradiado con 150 J/m² [+] o sin irradiar [-], fue mezclado con ADN "carrier" obtenido de células HT-1080 (19 μ g/placa) [B] o utilizado sin "carrier" [A]. Las células HT-1080 fueron transformadas por el método descrito en la sección de Métodos.

TABLA II

Efecto de la concentración de pSV2-*gpt* sobre la frecuencia de la transformación.

ADN $\mu\text{g/placa}$	COLONIAS $\text{Gpt}^+/10^6$ CÉLULAS RECEPTORAS		
	-UV	+UV	+/-
0.1	556	1180	2.12
0.3	1177	2026	1.72
1.0	1572	2298	1.46
3.0	1928	2349	1.22
10.0	2043	3302	1.62

El plásmido fue irradiado con 150 J/m^2 (+UV) o no (-UV) y luego fue introducido en células HT-1080 mediante la coprecipitación con fosfato de calcio.

obedecía a un efecto indirecto producido por la presencia de ADN dañado en las células receptoras, se mezclaron los plásmidos pSV2-*gpt* y pSV2-*neo* en experimentos de cotransformación. Cantidades iguales de pSV2-*gpt* sin irradiar y pSV2-*neo* irradiado o no fueron coprecipitadas e introducidas en las células receptoras. Las colonias Gpt⁺ y Neo⁺ fueron seleccionadas por separado en cultivos paralelos provenientes del mismo cultivo transformado originalmente. El plásmido sin irradiar produjo aproximadamente la misma cantidad de colonias resistentes, ya sea Gpt⁺ o Neo⁺; la irradiación de pSV2-*neo* produjo un aumento de colonias Neo⁺, pero no aumentó el rendimiento de colonias Gpt⁺ (Tabla III). Estos resultados indican que el incremento en la eficiencia de la transformación depende del daño al ADN transformante *per se*.

Efecto de la linealización del plásmido.

Algunas evidencias indican que en ciertas condiciones, el ADN de plásmido linealizado es capaz de transformar células más eficientemente que el ADN superhelicoidal (Folger et al, 1982; Linsley y Siminovitch, 1982). En este sentido es posible que el incremento en la frecuencia de la transformación observada con el plásmido irradiado pudiera ser el resultado de la conversión del ADN irradiado a la forma lineal por enzimas en las células receptoras. Para examinar esta hipótesis, se convirtió el pSV2-*gpt* a la forma lineal mediante el tratamiento con *EcoRI*, que corta el plásmido en un sitio único, fuera del gen *gpt* (Figura 2), y luego se determinó su eficiencia de transformación que se comparó con la de plásmidos irradiados o intactos. Los resultados indican que si bien la linealización del plásmido con *EcoRI* incrementó la transformación, el incremento causado por la irradiación es aproximadamente el mismo en el plásmido superhelicoidal y en el linealizado (Tabla IV). Este resultado sugiere que el aumento en transformación observado cuando el ADN es irradiado no se debe a la conversión del plásmido a la forma lineal dentro de las células transformadas. Cuando el plásmido fue linealizado con la restrictasa *KpnI*, que corta el gen *gpt* (Figura 2), la eficiencia de la transformación se redujo considerablemente (Tabla IV). Esto indica que ciertos tipos de daño

TABLA III

Efecto de lesiones en pSV2-*neo* sobre la frecuencia de la transformación con pSV2-*gpt*.

EXP.	CÉLULAS RECEPTORAS	IRRADIACIÓN	NEO ⁺		GPT ⁺	
			Frecuencia	+/-	Frecuencia	+/-
1	HT-1080		38		40	
			153	4.0	36	0.9
2	HT-1080		28		28	
			129	4.6	13	0.5
2	XP12RO-SV40		57		19	
			159	2.8	12	0.6

Las células receptoras fueron transformadas con mezclas de pSV2-*gpt* (0.5 µg/placa) sin irradiar, y pSV2-*neo* (0.5 µg/placa) irradiado (150 J/m²) o no como se indica en la tabla. La frecuencia de células transformadas está expresada en colonias/10⁵ células receptoras.

TABLA IV

Efecto de la linealización sobre la actividad transformadora de pSV2-*gpt*.

ADN	COLONIAS Gpt^+ /10 ⁶ CÉLULAS RECEPTORAS		
	A	B	B/A
Superhelicoidal	35	126	3.6
Lineal (<i>EcoRI</i>)	60	267	4.5
Lineal (<i>KpnI</i>)	3	5	1.7

El ADN de pSV2-*gpt* (1.2 μ g/placa), superhelicoidal o linealizado, fue irradiado con UV, 150 J/m² (B) o no (A), e introducido en células HT-1080.

en el gen son deletéreos para la transformación. La actividad transformadora residual observada con pSV2-*gpt*-*KpnI* pudo ser debida a la actividad de ligasas celulares, que pueden producir moléculas circulares o concatémicos, ya que los extremos cohesivos no fueron modificados.

Efecto de secuencias deletéreas.

En los experimentos descriptos previamente, se demostró que el incremento en la transformación requiere que el ADN del plásmido *per se* contenga lesiones. Quizá este incremento resulte del daño sufrido por secuencias en el plásmido que son deletéreas y que de alguna manera reducen la transformación. Las posibilidades incluyen la "secuencia venenosa" de pBR322 (Lusky y Botchan, 1981), o un fragmento de 121 de pares de bases (bp) localizado en el gen *gpt* entre los sitios de restricción de las restrictasas *HindIII* y *BglII* (Mulligan y Berg, 1981b), u otras secuencias de pBR322 (Yoder y Ganesan, 1983). La "secuencia venenosa" parece no ser la responsable porque el plásmido pSV2-*neo*, que no la contiene (Canaani y Berg, 1982), exhibió un aumento en su actividad transformadora luego de irradiado (Tabla III). La importancia de la secuencia de 121 bp en el extremo proximal del gen *gpt* fue examinada utilizando un plásmido derivado de pSV2-*gpt*, el pSV2-*gpt* Δ (*HindIII*-*BglII*) que fue construido mediante la delección de esa secuencia. La delección produjo un aumento en la expresión del gen *gpt* en células de mono CV-1 (Mulligan y Berg, 1981b). En el sistema aquí en estudio, se obtuvieron más colonias Gpt⁺ con el pSV2-*gpt* Δ (*HindIII*-*BglII*) que con el pSV2-*gpt*, y la irradiación con UV aumentó la transformación con ambos plásmidos (Tabla V), o sea que el efecto de la irradiación no es el de inactivar esa secuencia en particular. Para eliminar la porción de pSV2-*gpt* Δ (*HindIII*-*BglII*) que proviene del pBR322, el plásmido fue tratado con las restrictasas *EcoRI* y *PvuII*. Los dos fragmentos que resultaron fueron separados mediante electroforesis en geles preparativos de agarosa. El fragmento de 2.9 kbp que contiene el gen *gpt* y las secuencias del SV40 necesarias para su expresión fue purificado y utilizado para transformar células XP12RO-SV40. Los resultados (Tabla V) indican que la presencia de secuencias del pBR322 no son perniciosas para la transformación; además, el efecto de la irradiación sobre la transformación fue observado en

TABLA V

Efecto de secuencias deletéreas sobre la eficiencia de la transformación.

EXP.	CÉLULAS	ADN	COLONIAS Gpt ⁺ /10 ⁵ CÉL. RECEPTORAS		
			A	B	B/A
1	HT-1080	pSV2- <i>gpt</i>	1.6	6.0	3.8
		pSV2- <i>gpt</i> Δ(<i>Hind</i> III- <i>Bgl</i> I)	2.6	14.6	5.6
2	XP12RO-SV40	pSV2- <i>gpt</i> - <i>Eco</i> RI	9.0	28.0	3.1
		SV40- <i>gpt</i> (2.9 kb)	3.0	6.0	2.0

Las células receptoras indicadas fueron transformadas con 1.2 μg/placa de pSV2-*gpt* o de pSV2-*gpt*Δ(*Hind*III-*Bgl*I) (experimento 1) o con cantidades equimoleculares (1.6 x 10¹¹ moléculas/placa) del pSV2-*gpt* linealizado con *Eco*RI (0.9 μg/placa) o con el fragmento SV40-*gpt* de 2.9 kb obtenido al cortar el pSV2-*gpt*Δ(*Hind*III-*Bgl*I) con *Eco*RI y *Pvu*II (0.5 μg/placa) (experimento 2). El ADN fue irradiado con 150 J/m² de UV (B), o no irradiado (A).

ambos casos independientemente de la presencia o ausencia de las secuencias del pBR322.

CAPÍTULO 2º

IDENTIFICACIÓN DE LAS LESIONES QUE AUMENTAN LA ACTIVIDAD TRANSFORMADORA DE LOS PLÁSMIDOS pSV2 IRRADIADOS CON UV.

Introducción.

En el capítulo 1º se describió el aumento en la actividad transformadora de los plásmidos pSV2-*gpt* y pSV2-*neo* previamente irradiados y se descartaron algunas de las posibles causas de dicho fenómeno. En este capítulo se describen los tipos específicos de lesiones en el ADN que aumentan la transformación. Aunque la mayoría de las lesiones en el ADN producidas por dosis bajas de UV son los dímeros de pirimidinas, existen otros fotoproductos que pueden ser responsables del incremento en la transformación. Por ello se utilizaron varios agentes físicos o químicos para obtener distintos tipos de lesiones en el ADN de plásmidos, procediéndose a comparar su efecto sobre la frecuencia de la transformación.

Para evaluar la contribución de los dímeros de pirimidinas, se comparó la actividad transformadora de plásmidos irradiados con UV, con la de aquellos en los que los dímeros fueron reparados antes de la transformación a través de la fotorreactivación. Además, se irradió el ADN de plásmidos a 313 nm en condiciones fotosensibilizantes, que produce casi exclusivamente dímeros de timina (Rahn et al, 1974; Rahn, 1983). Se estudió además el efecto de un fotoproducto menor de la radiación de 254 nm, los glicoles de timina, tratando el ADN *in vitro* con OsO₄, que produce selectivamente este tipo de lesión. También se estudiaron los sitiosapurínicos e incisiones que pueden producirse como lesiones secundarias en los plásmidos, después de haber sido introducidos en las células receptoras.

La irradiación de las células receptoras, en lugar de los plásmidos, también aumenta la

frecuencia de la transformación (Debenham y Webb, 1984; Nagata et al, 1984; van Duin et al, 1985; Postel, 1985). Sin embargo, el efecto letal de la irradiación sobre las células limita la gama de las dosis de UV que pueden utilizarse, y complica la interpretación de los resultados. Por lo tanto, el estudio se ha limitado a la transformación de células intactas con plásmidos dañados.

Resultados

Dímeros de pirimidinas. Estas lesiones son las más frecuentes en ADN irradiado con dosis moderadas de UV de 254 nm. El rendimiento de dímeros de pirimidinas, medido mediante la cromatografía en capa delgada, fue aproximadamente lineal con respecto a la dosis de UV de hasta alrededor de 1.000 J/m^2 (Figura 4). Dentro de esta gama de dosis, 3 % de las timinas en pSV2-*gpt* fueron convertidas en dímeros por cada J/m^2 . Esto corresponde a 0.06 dímeros/molécula de pSV2-*gpt*/ J/m^2 , teniendo en cuenta que el plásmido posee 2804 residuos de timina/molécula y suponiendo que la relación T<>T : T<>C : C<>C = 59 : 34 : 7, calculada para *E. coli* (Setlow y Carrier, 1966), es válida para pSV2-*gpt*. Esta suposición se basa en que un 64 % de las secuencias del plásmido derivan de *E. coli* o de pBR322, y que su composición es similar a la de *E. coli* (~25 % timina). El valor obtenido es similar a la frecuencia de sitios sensibles a la endonucleasa V de T4 (Spivak et al, 1984; figura 1).

Para estudiar el efecto de los dímeros de pirimidinas sobre la actividad transformadora de los plásmidos, se utilizó la enzima fotorreactivante de *S. griseus*, obsequio del Dr. A. P. M. Eker. El tratamiento con la enzima fotorreactivante y luz visible convierte 97 % o más de los dímeros de pirimidinas en las bases originales, de manera que el ADN resulta resistente a la endonucleasa V de T4 (Figura 5 A); como consecuencia, el rendimiento de colonias transformadas se reduce (Figura 5 B). Este resultado indica que los dímeros de pirimidinas contribuyen en gran parte al incremento en la transformación causada por la UV, tanto en células normales como en células de XP. Resultados similares fueron obtenidos por van Duin et al (1985).

Figura 4. Conversión de timinas a dímeros pirimidina-timina en función de la dosis de UV de 254 nm. Los dímeros de pirimidinas que contienen timina fueron cuantificados mediante la cromatografía en capa delgada. Los distintos símbolos representan tres experimentos realizados por separado.

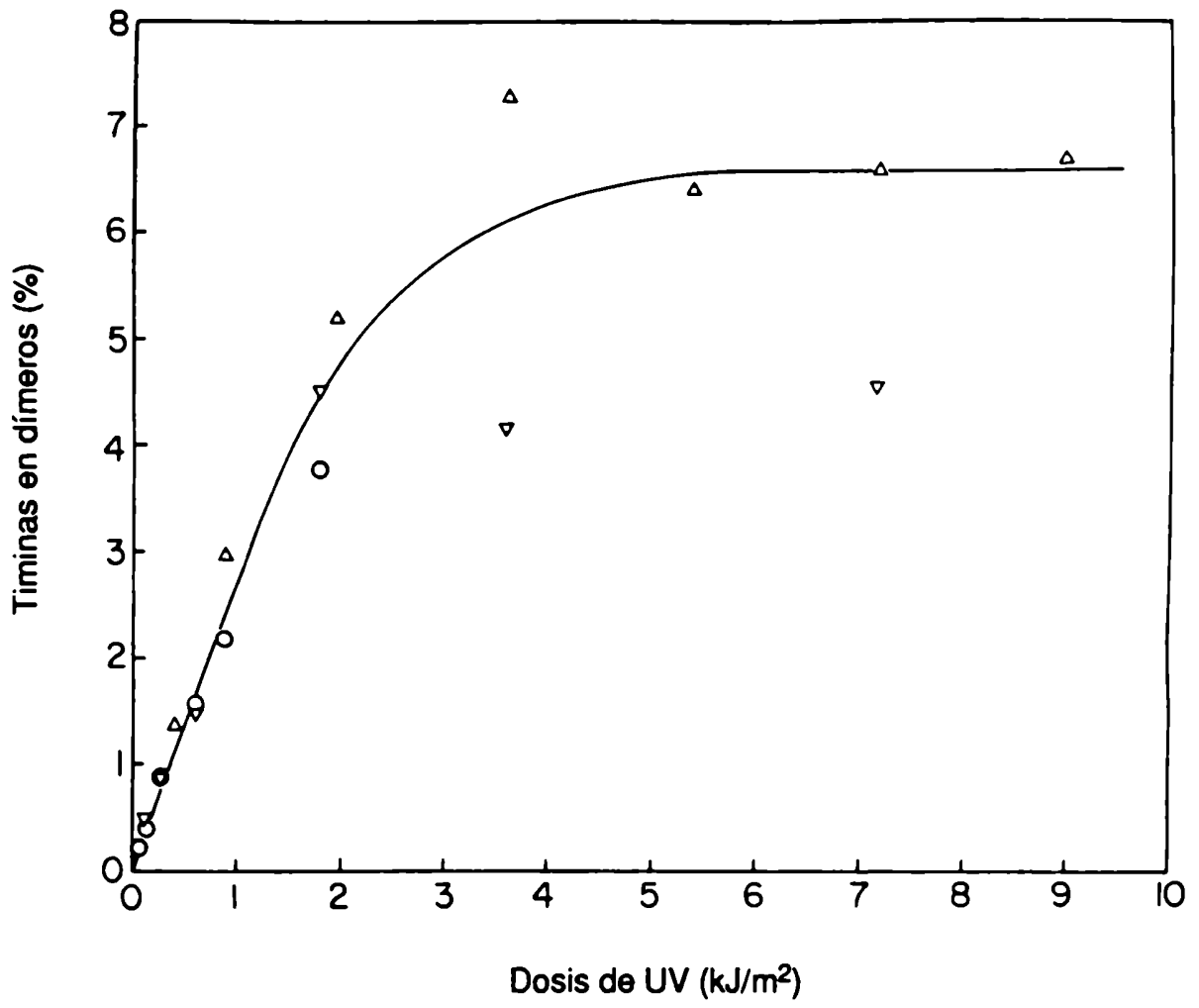
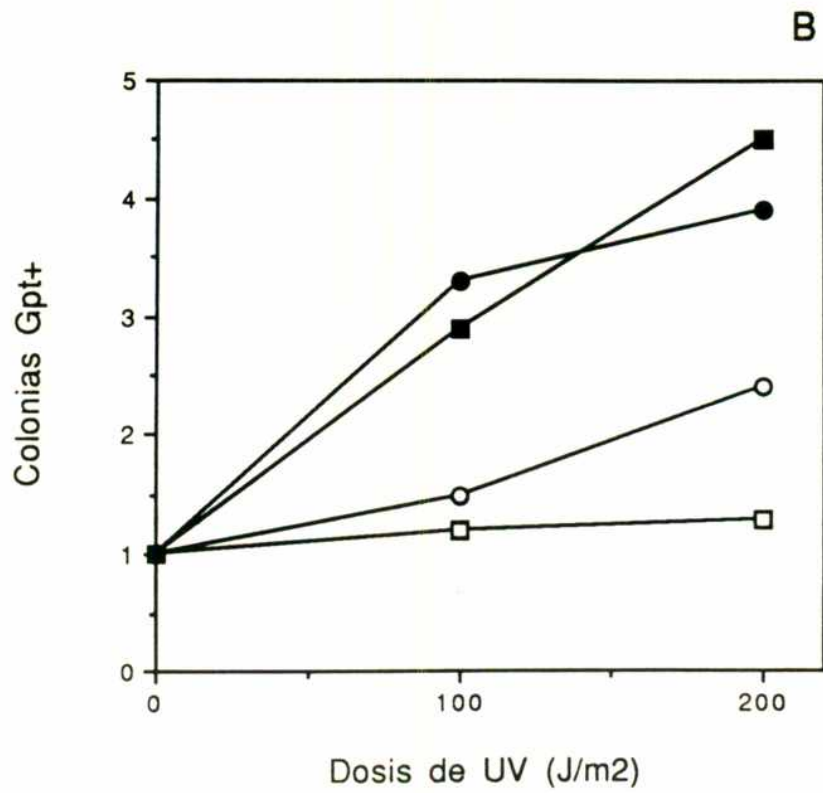
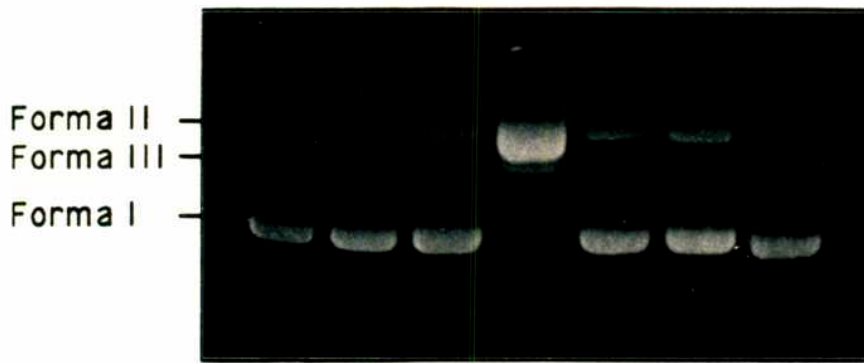


Figura 5. Fotorreactivación de dímeros de pirimidinas en pSV2-*gpt* irradiado con UV.

(A) Gel de agarosa 1% en el que se demuestra la reparación de los dímeros de pirimidinas mediante el tratamiento con enzima fotorreactivante y luz visible. El plásmido fue irradiado con 100 J/m² o no (UV), incubado con enzima fotorreactivante o no (PRE) e iluminado o no con luz visible (LUZ). La presencia de dímeros de pirimidinas en el ADN fue determinada mediante la digestión con la endonucleasa V de T4 (ENDO). (B) Efecto de la fotorreactivación sobre la actividad transformadora de pSV2-*gpt*. El ADN de los plásmidos fue irradiado o no, fotorreactivado (enzima fotorreactivante + luz, símbolos blancos) o no (enzima fotorreactivante - luz, símbolos negros). La frecuencia de colonias Gpt⁺ fue normalizada con respecto a la obtenida con ADN sin irradiar o fotorreactivar: 53/10⁵ células para HT-1080 (círculos) y 6/10⁵ células para XP12RO-SV40 (cuadrados).

A

UV	-	-	+	+	+	+	-
PRE	+	+	+	+	+	+	-
LUZ	-	-	-	-	+	+	-
ENDO	-	+	-	+	-	+	-



La irradiación con UV cercana (313 nm) en condiciones fotosensibilizantes produce dímeros de timinas casi exclusivamente (Rahn, 1983; Umlas et al, 1985). Cuando el pSV2-*gpt* fue irradiado con UV cercana en buffer con iones de plata y acetofenona, y en una atmósfera de nitrógeno, se obtuvieron más colonias Gpt⁺ que con el plásmido no irradiado (Tabla VI). El incremento de la actividad transformadora de pSV2-*gpt* que contiene dímeros de timina producidos por la irradiación fotosensibilizante fue similar al obtenido con pSV2-*gpt* que contenía una cantidad equivalente de dímeros de pirimidinas producidos por UV lejana (254 nm).

Los resultados de los experimentos de fotorreactivación y fotosensibilización indican que los dímeros de pirimidinas son las lesiones principalmente responsables por el efecto de la UV sobre la transformación; pero no descartan por completo la posibilidad de que haya otras lesiones que puedan aumentar la actividad transformadora de los plásmidos.

Otros fotoproductos. Altas dosis de UV de 254 nm pueden reducir la actividad transformadora de pSV2-*gpt* (Figuras 3 y 17). El rendimiento de dímeros de pirimidinas alcanza un plateau cuando la dosis de UV llega a los 4.000 J/m² o más (Figura 4), mientras que otras lesiones, que incluyen los glicoles de timina (Hariharan y Cerutti, 1977), los fotoproductos (6-4) (Ikenaga y Jagger, 1971; Wang, 1976; Brash y Haseltine, 1982) y entrecruzamientos intercatenarios ADN-ADN (Marmur y Grossman, 1961; Glisin y Doty, 1967) continúan acumulándose. De estas lesiones, se procederá a describir el análisis de los efectos causados por los glicoles de timina y los entrecruzamientos intercatenarios.

Para evaluar el efecto de los glicoles de timina sobre la actividad transformadora del ADN de los plásmidos, se trató el pSV2-*gpt* con OsO₄, el cual oxida selectivamente las timinas en ADN desnaturalizado, generando *cis*-glicoles de timina (Hariharan y Cerutti, 1974; Teebor et al, 1982). Se utilizaron dos procedimientos para cuantificar glicoles de timina en ADN tratado

TABLA VI

Efecto de la irradiación fotosensibilizante sobre la actividad transformadora de pSV2-*gpt*.

TRATAMIENTO	COLONIAS Gpt ⁺ /10 ⁵ CÉLULAS RECEPTORAS			
	HT-1080		XP12BE-SV40	
	EXP. 1	EXP. 2	EXP. 1	EXP. 2
No tratado	18 (1.0)	13 (1.0)	10 (1.0)	11 (1.0)
UV 254 nm	87 (4.8)	69 (5.3)	17 (1.7)	31 (2.8)
UV 313 nm:				
0 min	20 (1.0)	47 (1.0)	10 (1.0)	22 (1.0)
20 min	135 (6.8)	119 (2.5)	29 (2.9)	50 (2.3)
40 min	160 (8.0)	145 (3.1)	26 (2.6)	56 (2.5)

Las células receptoras fueron transformadas con pSV2-*gpt* sin irradiar, o irradiado con UV de 254 nm (200 J/m²) o con UV de 313 nm en condiciones fotosensibilizantes. La irradiación con UV de 254 nm produjo 12 dímeros de pirimidinas por molécula; la irradiación fotosensibilizante produjo 0.35 y 0.70 dímeros de timina por molécula de plásmido por min en los experimentos 1 y 2 respectivamente. Los números entre paréntesis indican las frecuencias relativas de la transformación obtenidas con plásmidos irradiados con UV de 254 nm; los números entre llaves indican las frecuencias relativas obtenidas con plásmidos fotosensibilizados.

con OsO_4 ; incisión por la endonucleasa III de *E. coli* (Katcher y Wallace, 1983) y un ELISA utilizando un anticuerpo monoclonal contra los glicoles de timina en ADN (Leadon y Hanawalt, 1983). El tratamiento de pSV2-*gpt* con 0.1 % OsO_4 produce aproximadamente 1.4 sitios sensibles a la endonucleasa, y aproximadamente 0.6 sitios sensibles al anticuerpo. Esta discrepancia puede ser debida a que el anticuerpo reconozca sólo una cierta subclase de glicoles de timina, o a que la endonucleasa III reconozca otras lesiones, además de los glicoles de timina (Katcher y Wallace, 1983; Breimer y Lindahl, 1984). Por ejemplo, la endonucleasa III contiene una actividad que corta los sitios apurínicos en ADN (Katcher y Wallace, 1983); pero la diferencia entre los sitios sensibles a la endonucleasa y al anticuerpo no es debida a la presencia de sitios apurínicos en el ADN tratado con OsO_4 , a juzgar por su resistencia a la endonucleasa V de T4 que también contiene una actividad cortadora de sitios apurínicos (Gordon y Haseltine, 1980).

Utilizando el anticuerpo específico contra los glicoles de timina, se determinó el contenido de estas lesiones en el plásmido pSV2-*gpt* irradiado con UV de 254 nm. La producción de glicoles de timina resultó ser lineal con respecto a la dosis, y con una frecuencia de 40 sitios/ 10^6 residuos de timina, o 0.11 sitios/molécula de plásmido por cada 1.000 J/m^2 . La concentración de OsO_4 más alta utilizada produjo 6 sitios sensibles al anticuerpo (o 14 sitios sensibles a la endonucleasa III); una dosis de UV de aproximadamente 50.000 J/m^2 sería necesaria para producir un nivel equivalente de estas lesiones. Este nivel de glicoles de timina ni aumentó ni redujo el rendimiento de colonias Gpt^+ (Tabla VII). Este resultado indica que los glicoles de timina no son responsables de ningún cambio en la actividad transformadora de los plásmidos irradiados con UV.

Cuando el plásmido pSV2-*gpt* lineal fue irradiado con altas dosis de UV de 254 nm y analizado en gradientes de sacarosa alcalinos, la mayor parte del ADN se distribuyó en un pico con un peso molecular promedio (M_n) que decrecía a medida que se aumentaba la dosis de UV.

TABLA VII

Efecto del tratamiento con OsO₄ sobre la actividad transformadora de pSV2-*gpt*

TRATAMIENTO	LESIONES POR MOLÉCULA	COLONIAS Gpt ⁺ POR 10 ⁵ CÉLULAS	NORMALIZACIÓN RESPECTO DEL CONTROL
Control	0	62	1.0
UV	12.0 dímeros	193	3.1
OsO ₄			
0.25 %	1.9 glicoles	51	0.8
0.50 %	3.3 glicoles	40	0.6
1.00 %	5.9 glicoles	59	0.9

El pSV2-*gpt* tratado con OsO₄ fue utilizado para transformar células HT-1080. El ADN control fue tratado exactamente igual, excepto que el OsO₄ fue omitido. El número de glicoles de timina fue calculado en base al número de sitios sensibles al anticuerpo. Una muestra de ADN control fue irradiada con 200 J/m² de 254 nm (UV).

Este comportamiento es consistente con la producción de sitios sensibles al alcali, o de incisiones. Además, cuando la dosis de UV aumentaba, se desarrollaba un escalón en el pico, en una posición que correspondía a un peso molecular aproximadamente doble del de una molécula monocatenaria no irradiada; este escalón podría contener moléculas compuestas por dos cadenas de ADN unidas por entrecruzamientos (Figura 6). Para determinar si en las condiciones de irradiación utilizadas se producen cruzamientos intercatenarios ADN-ADN, se desnaturizó el pSV2-*gpt* lineal y se analizó su comportamiento en electroforesis en geles de agarosa a pH neutro (Vos, 1988). En estas condiciones, el ADN no irradiado migró como una banda en la posición que corresponde al ADN monocatenario, mientras que el ADN irradiado fue resuelto en dos bandas, una en la posición de ADN monocatenario y la otra en la del bicatenario (Figura 7 A). El hecho de que cierta proporción de ADN migre en la posición de plásmidos bicatenarios puede atribuirse a entrecruzamientos que sostienen las dos cadenas de ADN complementarias juntas durante la desnaturalización. La proporción de ADN que migra en la posición de plásmido monocatenario se redujo exponencialmente con el aumento en las dosis de UV (Figura 7 B). Utilizando la fórmula de Poisson para calcular el número promedio de entrecruzamientos por molécula de plásmido a partir de la fracción de ADN que permaneció libre de lesiones, se estimó que cada 1.000 J/m^2 producen 0.4 entrecruzamientos. A causa de la prevalencia de otras lesiones en ADN irradiado con UV de 254 nm, no se pudo evaluar la contribución de los entrecruzamientos intercatenarios ADN-ADN causados por la UV, a la actividad transformadora del ADN de plásmidos. Más adelante se analizará el efecto de los entrecruzamientos intercatenarios producidos por otros agentes tales como los psoralenos.

Lesiones secundarias. Cuando los plásmidos dañados son introducidos en las células receptoras, ciertas lesiones secundarias podrían aparecer en el ADN de los plásmidos como resultado de la actividad de enzimas celulares. Por ejemplo, algunas lesiones en el ADN pueden ser transformadas en sitios apurínicos espontáneamente o debido a la acción de glicosilasas del ADN (Lindahl, 1980). Algunas lesiones, incluyendo los sitios apurínicos, pueden ser reconocidas

Figura 6. Efecto de la UV sobre la sedimentación de pSV2-*gpt* en gradientes de sacarosa alcalinos. El ADN de pSV2-*gpt* marcado con ¹⁴C fue linealizado con EcoRI, irradiado con UV de 254 nm (cuadrados, 0 J/m²; triángulos, 4.000 J/m²; círculos, 8.000 J/m²) y centrifugado en gradientes de sacarosa alcalinos, descritos en la sección de Métodos, a 45.000 rpm durante 3 hr. Las fracciones han sido numeradas del fondo al tope de cada gradiente.

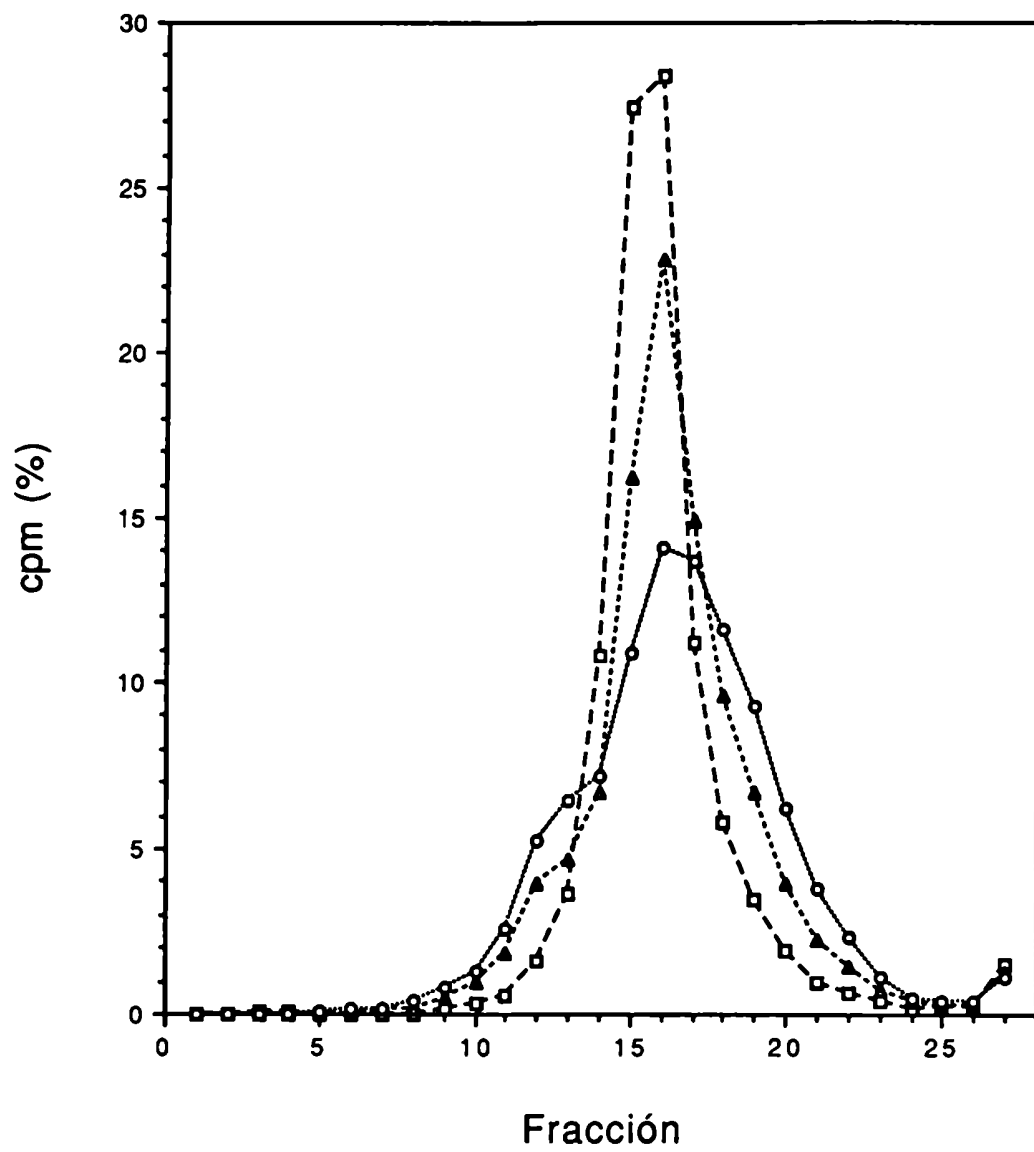
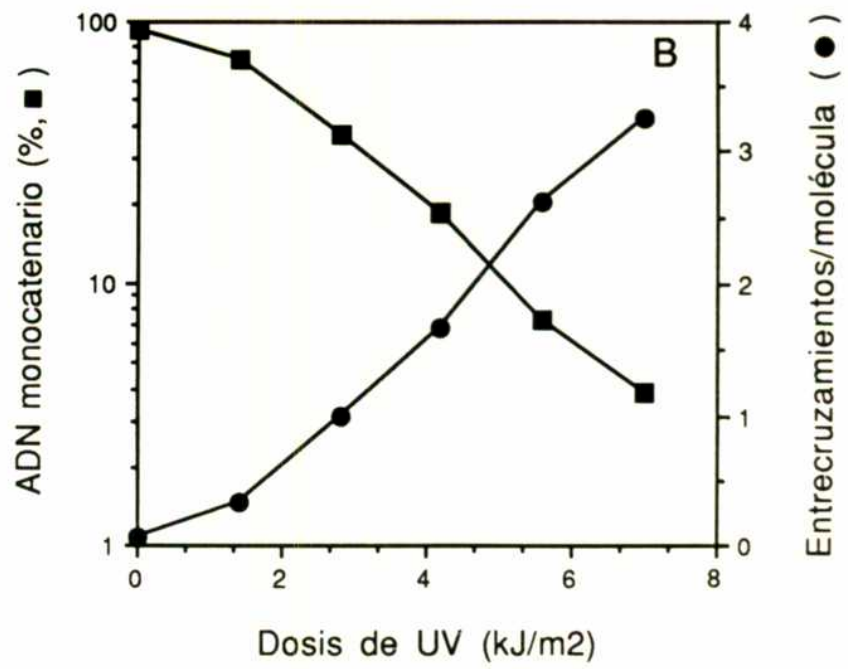
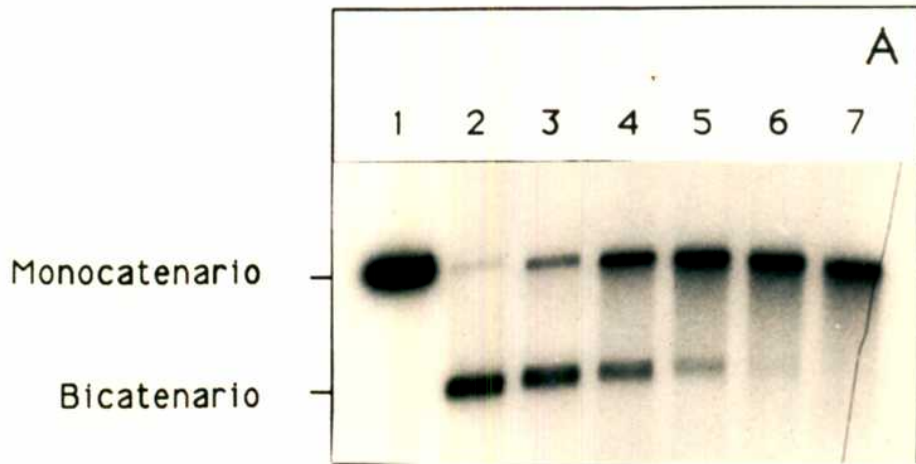


Figura 7. Producción de entrecruzamientos intercatenarios en el plásmido pSV2-*gpt* irradiado con UV de 254 nm. (A) Autorradiografía de un gel de agarosa que demuestra entrecruzamientos intercatenarios en el pSV2-*gpt* lineal marcado con ^{32}P , como función de la dosis de UV. Carril 1: ADN nativo; carriles 2-7: ADN desnaturalizado después de ser irradiado con 0, 1.4, 2.8, 4.2, 5.6 y 7.0 kJ/m^2 respectivamente. El ADN sin entrecruzamientos fue convertido en la forma monocatenaria por la desnaturalización mientras que el ADN que contenía por lo menos un entrecruzamiento por molécula migró como bicatenario. (B) Representación de la fracción del pSV2-*gpt* que migra como monocatenario, luego de ser desnaturalizado, y del número promedio de entrecruzamientos por molécula de plásmido, en función de la dosis de UV.



por endonucleasas específicas que producen incisiones en esos sitios.

Para determinar si los sitiosapurínicos podían incrementar la actividad transformadora de los plásmidos, se generaron sitiosapurínicos en el plásmido pSV2-*gpt* mediante un calentamiento en buffer ácido. Los resultados, que aparecen en la Tabla VIII, demuestran que la frecuencia de la transformación en células HT-1080 no fue afectada por la presencia de sitiosapurínicos en el plásmido, mientras que se observaron más células transformadas con plásmidos que contenían una cantidad equivalente de dímeros de pirimidinas. Cuando se extendió el tratamiento hasta obtener 32 sitiosapurínicos por molécula de plásmido, o cuando se trató el ADN que contenía sitiosapurínicos con la endonucleasa III de *E. coli* para producir una incisión en cada sitio, la frecuencia de la transformación se redujo significativamente (datos no presentados).

Para evaluar el efecto de las incisiones específicas en los dímeros de pirimidinas sobre la transformación, se trató el pSV2-*gpt* irradiado, con la endonucleasa V de T4, la cual corta al ADN en los dímeros de pirimidinas pero no los elimina (Yasuda y Sekiguchi, 1970; Friedberg y King, 1971; Gordon y Haseltine, 1980). El efecto de la irradiación no fue alterado por el tratamiento con la endonucleasa V, aunque pudo observarse que la presencia de la enzima redujo la actividad transformadora de los plásmidos irradiados y no irradiados. Estos resultados fueron similares en células normales y en células de XP-A (Tabla IX).

TABLA VIII

Efecto de los sitios apurínicos sobre la actividad transformadora de pSV2-*gpt*

ADN	LESIONES POR MOLÉCULA	COLONIAS Gpt ⁺ /10 ⁶ CÉLULAS RECEPTORAS	
		EXP. 1	EXP. 2
No tratado	0	556 (1.0)	411 (1.0)
UV	9.0	3296 (5.9)	2732 (6.6)
Tratado 0 min	0	543 (1.0)	313 (0.8)
15 min	1.5	679 (1.2)	509 (1.2)
30 min	3.0	607 (1.1)	305 (0.7)
60 min	6.0	679 (1.2)	241 (0.6)
120 min	12.1	496 (0.9)	239 (0.6)

El plásmido pSV2-*gpt* no tratado, fue irradiado con UV de 254 nm (150 J/m²) o tratado con calor y ácido, e introducido en células HT-1080. La irradiación produjo 9.0 dímeros de pirimidinas/molécula de plásmido; el tratamiento con calor y ácido produjo 0.1 sitios apurínicos y 0.005 incisiones/molécula de plásmido/min. Los números entre paréntesis indican las relaciones entre las frecuencias de la transformación obtenidas con el plásmido tratado en relación a las obtenidas con el plásmido no tratado.

TABLA IX

Efecto del tratamiento de pSV2-*gpt* con la endonucleasa V de T4 sobre su actividad transformadora.

CÉLULAS	DOSIS DE UV J/m ²	COLONIAS Neo ⁺ /10 ⁶ CÉLULAS		
		- ENDONUCL.	+ ENDONUCL.	-/+
HT-1080	0	27 (1.0)	13 (1.0)	2.1
	200	179 (6.6)	102 (7.8)	1.8
	400	189 (7.0)	105 (8.1)	1.8
XP12RO-SV40	0	24 (1.0)	9 (1.0)	2.7
	200	136 (5.7)	42 (4.7)	3.2
	400	105 (4.4)	44 (4.9)	2.4

El plásmido pSV2-*neo* fue irradiado o no, incubado durante 30 min a temperatura ambiente en NaCl 100 mM, EDTA 10 mM, Tris 10 mM pH 8, BSA 0.2 µg/ml con o sin endonucleasa V de T4, e introducido en las células receptoras indicadas. Los números entre paréntesis indican las frecuencias de la transformación obtenidas con plásmido irradiado, relativas a las obtenidas con plásmido no irradiado.

CAPÍTULO 3^a

EFFECTO DE LA IRRADIACIÓN DEL ADN DE PLÁSMIDOS SOBRE LA EXPRESIÓN TRANSITORIA.

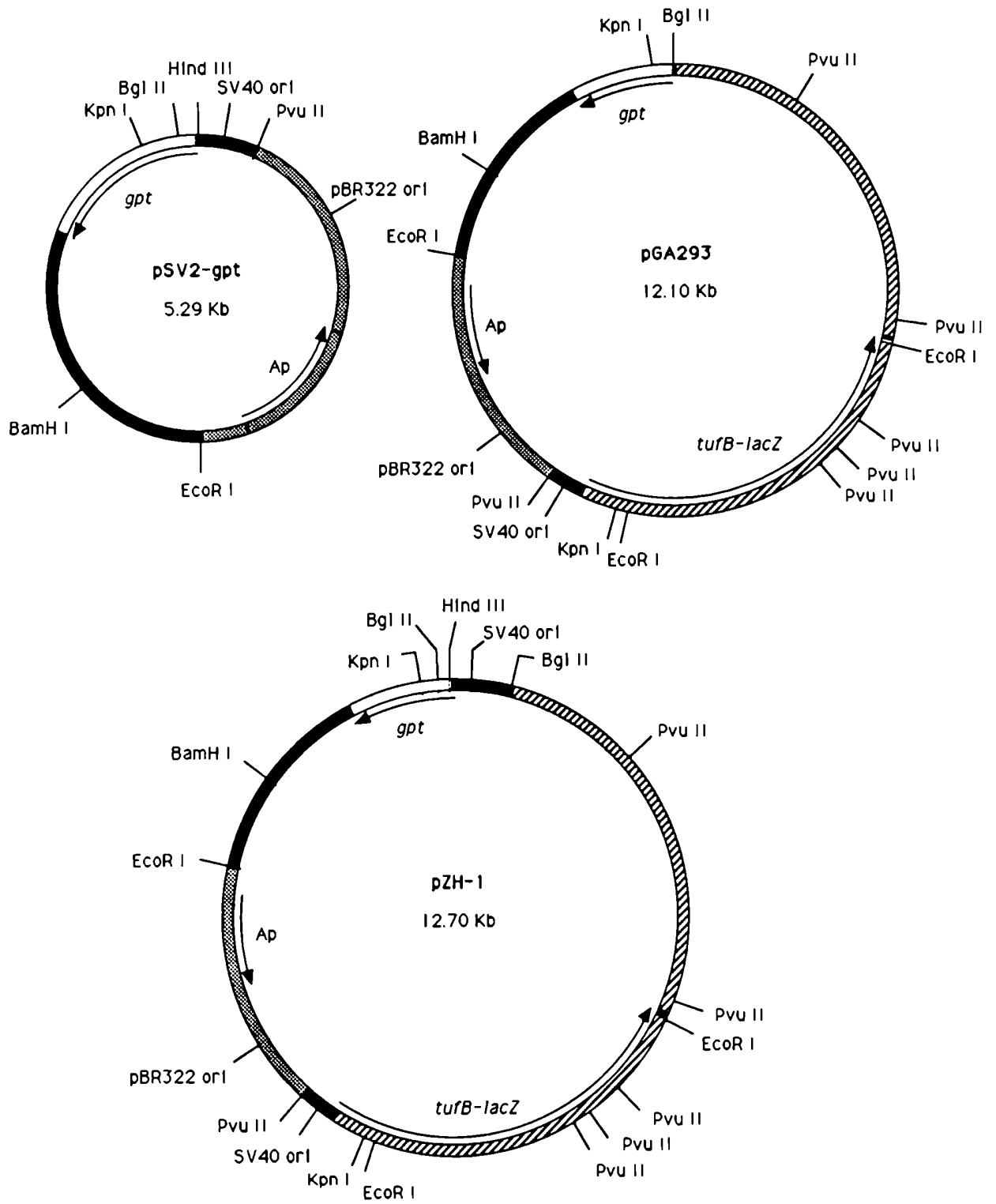
Introducción

Cuando los genes contenidos en los plásmidos están flanqueados por secuencias que permiten su expresión, como promotores, señales de empalme y de poliadenilación, la actividad de las enzimas codificadas por esos genes puede ser medida en extractos de las células receptoras. Una posibilidad para explicar el aumento en la transformación observada cuando el ADN de plásmidos es dañado con UV, es que la irradiación cause un aumento en la actividad de las enzimas codificadas por el plásmido, que a su vez aumentaría la probabilidad de las células de sobrevivir las condiciones selectivas y formar colonias. Se decidió por ello estudiar el efecto de la irradiación sobre la expresión transitoria de los genes portados por los plásmidos. Con ese propósito, se analizó la actividad de la β -galactosidasa, una enzima codificada por el gen *lacZ* de *E. coli*. El plásmido pGA293 derivado de pGA291, fue construido mediante la inserción en el pSV2-*gpt* de un fragmento de ADN de *E. coli* que incluye la región de los genes *tufB* y *lacZ*. Este fragmento fue insertado a continuación del promotor de SV40 y causó la interrupción del gen *gpt*, resultando en la inactivación de *gpt* (An et al, 1982; Figura 8). El ensayo para la actividad de la β -galactosidasa se basa en su capacidad de hidrolizar *o*-nitrofenil- β -D-galactósido (ONPG) con producción de galactosa y *o*-nitrofenol. La concentración del *o*-nitrofenol, que es amarillo, se midió a 420 nm.

Resultados

Para determinar las condiciones óptimas del ensayo de la acción de la UV sobre la expresión transitoria, se realizaron experimentos en los que se midió la expresión de la

Figura 8. Mapas de los plásmidos pSV2-*gpt*, pGA293 y pZH-1. El pZH-1 fue construido a partir del fragmento *PvuII*-*Bam*HI que contiene el gen *gpt* de pSV2-*gpt* y el fragmento *Bam*HI-*Bgl*III sin *gpt* de pGA293. Las regiones sombreadas indican las secuencias del pBR322; las regiones negras, secuencias del SV40; las regiones blancas, el gen *gpt* y las regiones rayadas, los genes *tufB* y *lacZ*.



β -galactosidasa en relación a la cantidad del pGA293 introducida en las células. La figura 9 indica que concentraciones entre 1.0 y 2.6 μg de ADN/placa resultan en actividades suficientemente altas como para ser medidas, y en una relación lineal respecto de dichas concentraciones. También se estudió el curso de la reacción con respecto al tiempo transcurrido entre la transformación y la cosecha de las células para preparar los extractos. Esta actividad comienza a ser evidente a las 12 horas después de la transformación, y alcanza un máximo entre las 24 y las 48 horas (Figura 10). En células no permisivas (ver capítulo 5ª), en que los plásmidos no son duplicados, la actividad luego decrece hasta ser casi imperceptible, posiblemente debido a la pérdida o degradación de los plásmidos que no se han integrado en el ADN de las células, las que son cultivadas en medio sin agentes selectivos, de manera que las células que han integrado plásmidos no poseen ninguna ventaja y son gradualmente diluidas.

Para estudiar el efecto de la irradiación de pGA293 sobre la expresión de la β -galactosidasa en células HT-1080, se trató el ADN del plásmido con dosis de UV entre 200 y 2.000 J/m^2 , y luego de ello se lo introdujo en las células receptoras mediante la coprecipitación con fosfato de calcio. Los extractos fueron preparados 48 horas después de la transformación. La irradiación causó la inactivación de *lacZ*, siendo la misma proporcional a la dosis de UV (Figura 11).

Es posible que la diferencia en las respuestas a la UV obtenidas con la transformación estable con pSV2-*gpt* descrita en el capítulo 1ª y la expresión transitoria con pGA293 se debiera a alguna diferencia en la manera en que estos dos plásmidos son procesados en las células receptoras. Por ello se decidió construir un plásmido en el que ambos genes, *lacZ* y *gpt*, puedan ser expresados. El plásmido pGA293 fue tratado con la restrictasa *Bgl*III, los extremos cohesivos fueron rellenados mediante el tratamiento con la ADN-polimerasa de T4, y luego de una restricción con *Bam*HI, el fragmento mayor fue separado en un gel de agarosa y purificado. El pSV2-*gpt* fue tratado con las restrictasas *Pvu*II y *Bam*HI y el fragmento menor que contiene

Figura 9. Actividad de la β -galactosidasa en función de la concentración de pGA293.
Las células HT-1080 fueron transformadas con varias cantidades de pGA293, cosechadas luego de 48 horas, y analizadas para determinar la actividad de la β -galactosidasa. Los símbolos representan datos de tres placas analizadas independientemente para cada cantidad de plásmido.

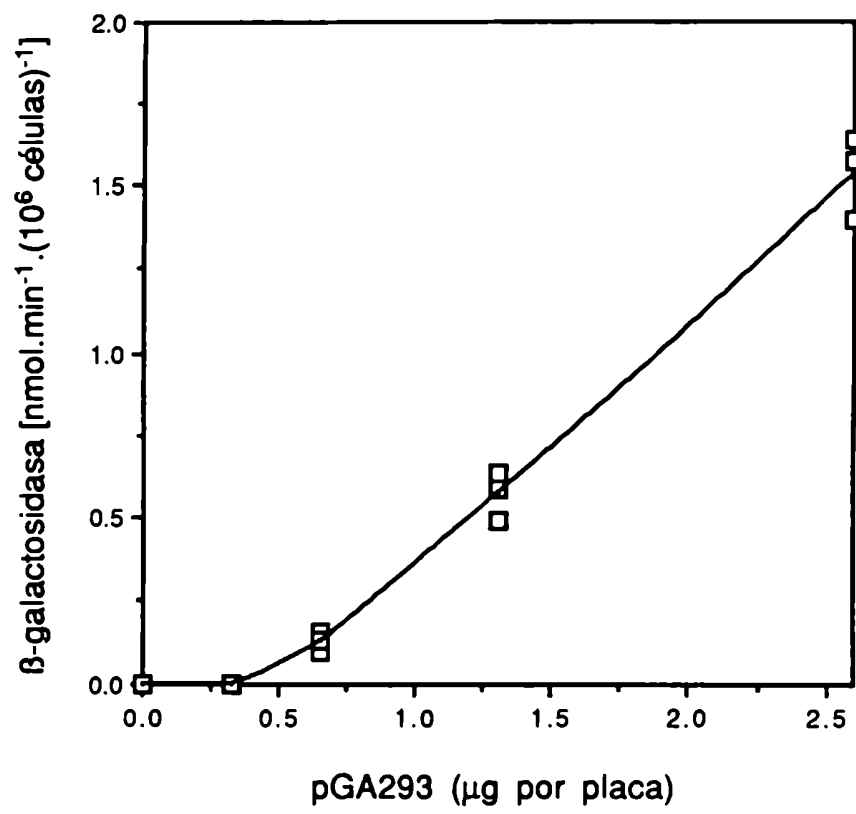


Figura 10. Actividad de la β -galactosidasa en función del tiempo. Las células HT-1080 fueron transformadas con 1.3 μ g del pGA293 por placa y cosechadas después de intervalos, entre 12 horas y 10 días. Los símbolos representan datos de dos experimentos independientes.

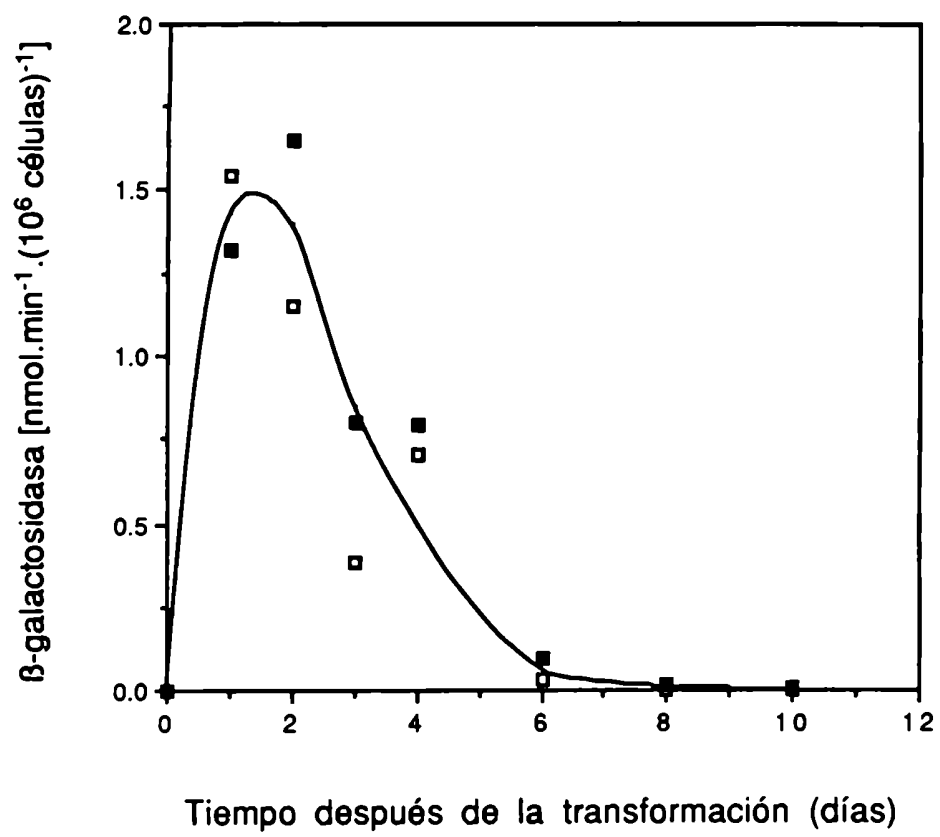
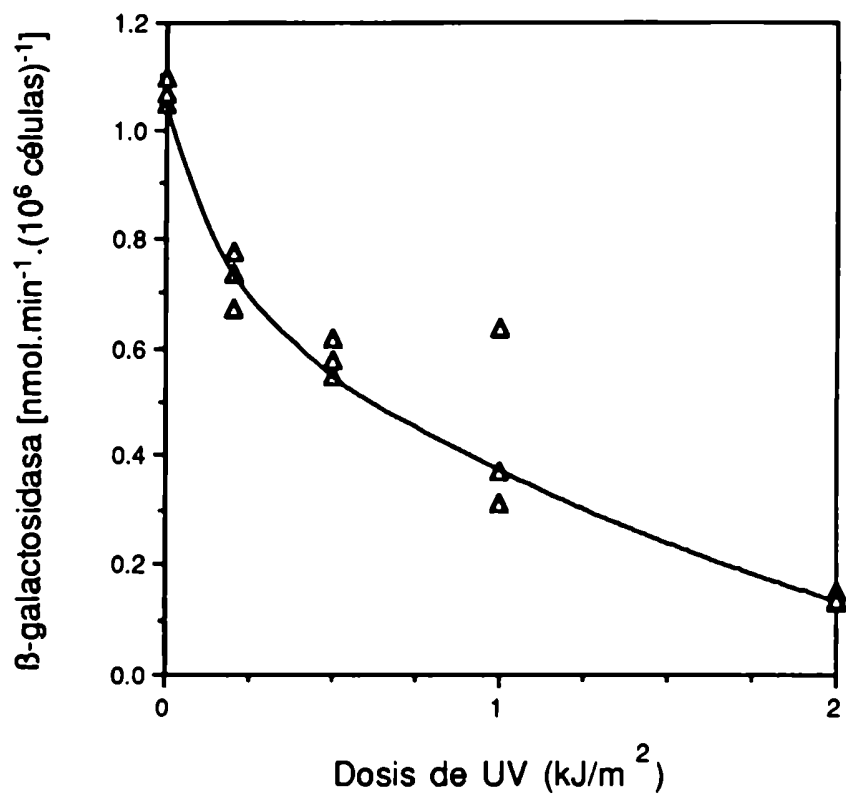


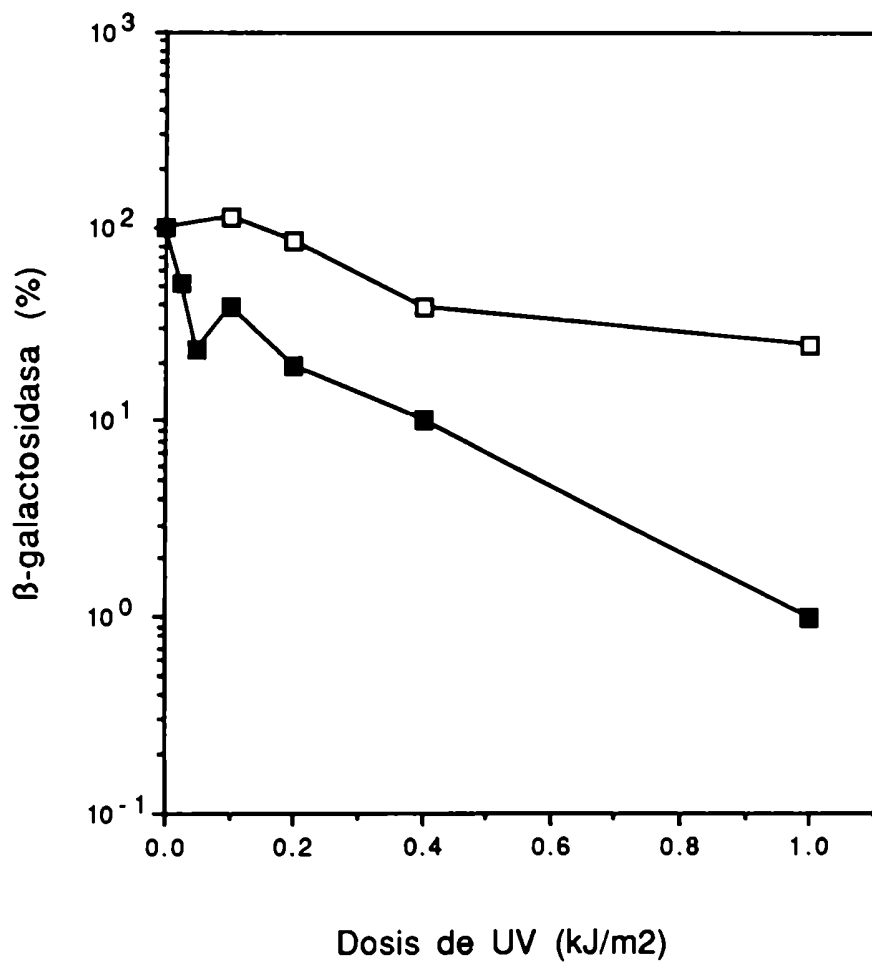
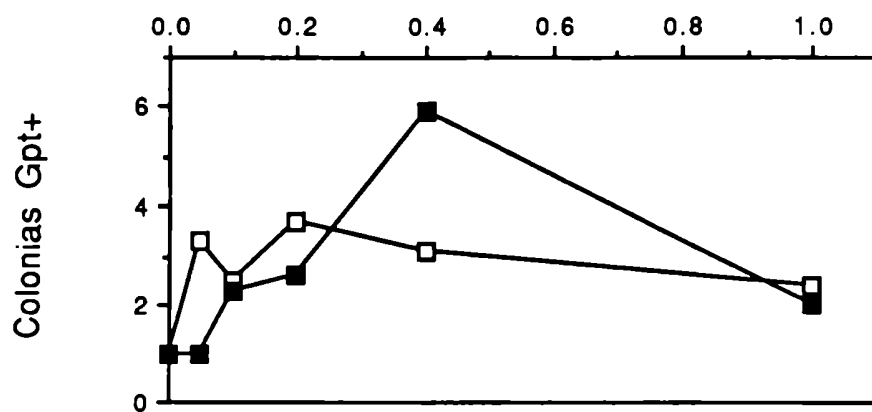
Figura 11. Efecto de la irradiación sobre la expresión transitoria de la β -galactosidasa.
Las células HT-1080 fueron transformadas con 1.3 μ g de pGA293 sin irradiar o irradiado con varias dosis de UV. Tres placas de células fueron transformadas por separado para cada dosis. Luego de 48 horas, las células fueron cosechadas y analizadas como fue descrito previamente.



las secuencias de SV40 y *gpt* fue purificado y ligado al fragmento mayor de pGA293 en condiciones que favorecen el ligado de extremos romos. De esta manera, se reemplazó el *gpt* incompleto de pGA293 por un *gpt* activo. El nuevo plásmido, pZH-1 (Figura 8) fue introducido en la cepa SN554 de *E. coli* (SN554 proviene de MC1024, que fue modificada por la Dra. A. K. Ganesan en nuestro laboratorio para eliminar el transposón Tn10 y para convertirla en auxótrofa de timina). Las bacterias transformadas por pZH-1 fueron aisladas gracias a su resistencia a la ampicilina y a su capacidad de metabolizar la X-galactosa en el medio de cultivo. El pZH-1 fue estudiado para confirmar su estructura y tamaño, y transferido a la cepa HB101 de *E. coli*, que mantiene plásmidos en forma más estable. Una vez caracterizado, el plásmido pZH-1 fue utilizado para transformar células humanas; la actividad de ambos genes, *lacZ* y *gpt*, fue confirmada.

Para estudiar el efecto de la irradiación sobre las actividades que son codificadas por el pZH-1, se trató al ADN del plásmido con varias dosis de UV hasta 1.000 J/m² y se lo utilizó para transformar células humanas con sistemas de reparación normales o defectuosos. Las células transformadas con plásmido irradiado con cada dosis fueron divididas en dos partes: una parte fue sembrada en medio selectivo para obtener colonias Gpt⁺, mientras que la otra parte fue lisada y analizada para cuantificar la actividad de la β -galactosidasa. La frecuencia de la transformación estable sufrió un aumento dependiente de la dosis de UV e independiente de la capacidad de las células receptoras de reparar el daño al ADN, de un modo similar al observado en experimentos con pSV2-*gpt*; la actividad transitoria, por el contrario, fue reducida como se observó con pGA293. Además, esta reducción fue mucho más marcada en células de XP (Figura 12). Protic-Sabljić y Kraemer (1985) obtuvieron resultados similares con plásmidos que contienen el gen *cat* que codifica la acetiltransferasa del cloramfenicol; estos autores determinaron que un dímero de pirimidinas en el gen es suficiente para inactivarlo en células de XP. Estos resultados indican que el incremento en la transformación estable observada con plásmidos irradiados, no se relaciona con un aumento en el nivel de la expresión transitoria en

Figura 12. Efecto de la irradiación sobre la expresión transitoria y la integración estable del plásmido pZH-1. El plásmido pZH-1 fue irradiado con varias dosis de UV, o no, e introducido en células HT-1080 (cuadrados blancos) o XP12RO-SV40 (cuadrados negros). La actividad de la β -galactosidasa fue medida después de 48 horas; una fracción de cada cultivo fue resembrada en medio selectivo para determinar la frecuencia de colonias Gpt⁺. La frecuencia de la transformación estable (panel superior) y la actividad de la β -galactosidasa (panel inferior) fueron normalizadas con respecto a los valores obtenidos con plásmido sin irradiar.



las células receptoras. Además, proveen evidencia de que la reparación de plásmidos dañados puede ocurrir en las células receptoras con sistemas de reparación intactos, y que esta capacidad de reparar el ADN de los plásmidos no afecta la frecuencia de la transformación estable.

CAPÍTULO 4^a

FACTORES QUE MODIFICAN LA ESTRUCTURA DEL ADN DE LOS PLÁSMIDOS pSV2.

Introducción

En los capítulos anteriores se analizó el efecto de las lesiones producidas por la UV sobre la frecuencia de la transformación de células humanas. En este capítulo se describirán algunos otros aspectos del fenómeno del aumento en la transformación, observado cuando el ADN de los plásmidos contiene dímeros de pirimidinas.

El estado en que se encuentra la cromatina de las células o de los plásmidos puede tener cierta significancia en el proceso de la transformación. Cuando las células de mamíferos son tratadas con butirato de sodio, se produce una gama de respuestas, entre ellas una inducción de la síntesis de varias proteínas, y un relajamiento en el empaquetamiento de la cromatina. En particular, el tratamiento con butirato de sodio inmediatamente después de la transformación incrementa la expresión de genes en plásmidos introducidos en las células, y también aumenta el número de células transformadas que sobreviven la selección (Gorman et al, 1983). Existe evidencia de que los plásmidos necesitan ser transportados al núcleo e incorporados en estructuras cromatinicas para que sus genes puedan ser expresados; los trabajos de varios laboratorios apoyan la idea de que la acción del butirato de sodio sobre la transformación se debe a su efecto sobre la cromatina. Las observaciones en este trabajo de Tesis podrían ser explicadas si los dímeros de pirimidinas ocasionaran un efecto similar al del butirato de sodio sobre la estructura cromatinica de los plásmidos.

Los dímeros de pirimidinas causan distorsiones en la estructura del ADN que pueden ser substratos de enzimas que reconocen las lesiones *per se* o las deformaciones en la cromatina que

ellas causan; estas enzimas, mediante mecanismos como la recombinación, podrían facilitar la integración de los plásmidos en el ADN celular. Si este fuera el caso, otros tipos de lesiones voluminosas que causan distorsiones en el ADN de los plásmidos deberían afectar la transformación de la misma manera. Para evaluar esta idea, se utilizaron dos agentes químicos, el *N*-acetoxi-2-acetilaminofluoreno (NA-AAF) y el 4'-hidroximetil-4,5',8-trimetilpsoraleno (HMT), para producir lesiones que distorsionan el ADN del pSV2-*gpt*.

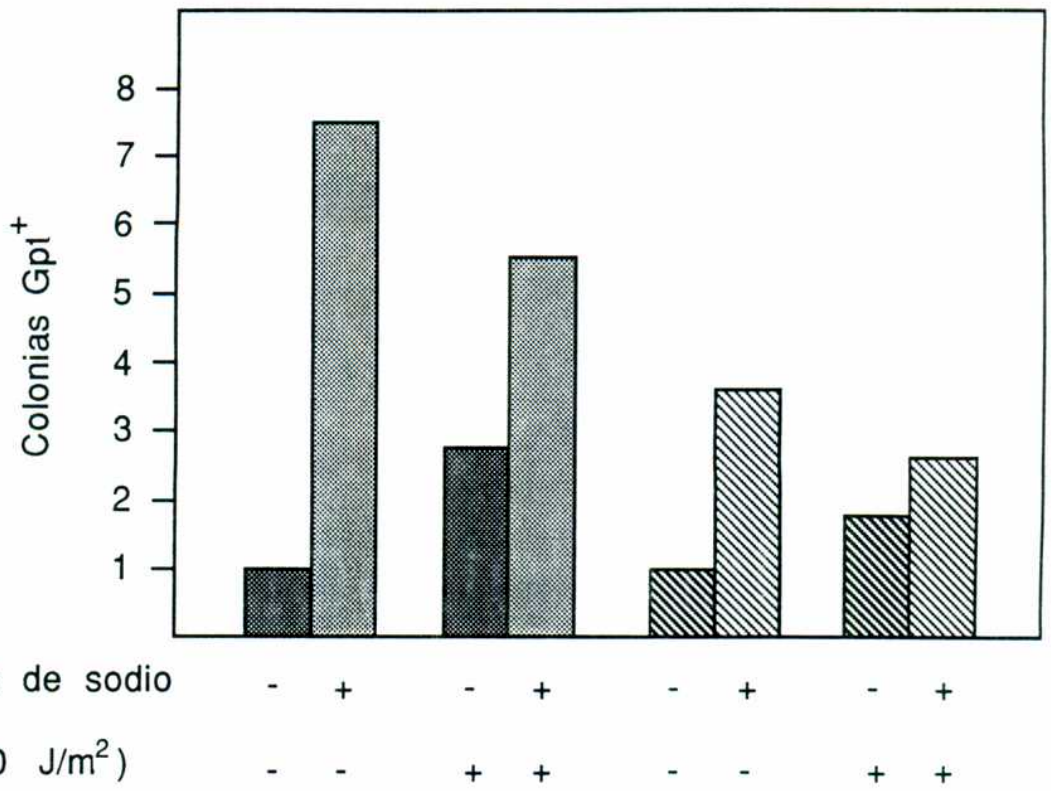
Resultados

Efecto del tratamiento de las células receptoras con butirato de sodio

Transformación estable. Para evaluar el efecto del butirato de sodio sobre la transformación estable de células humanas con plásmidos irradiados con UV de 254 nm, se introdujo el pSV2-*gpt* en las células mediante la coprecipitación con fosfato de calcio; después de 4 horas se trató las células con glicerol e inmediatamente después con el butirato de sodio (concentración final 5 mM). Alrededor de 18 horas después el medio fue reemplazado con medio sin butirato de sodio, y 48 horas después las células fueron sembradas en medio selectivo. El tratamiento con butirato produce una detención casi total de la división celular; este efecto desaparece cuando la droga es eliminada del medio de cultivo (Parker et al, 1986). Este elemento fue tenido en cuenta para el cálculo y la comparación de las frecuencias de transformación obtenidas con células tratadas, o no, con butirato de sodio. Los resultados (Figura 13) indican que el butirato de sodio causa un aumento en la transformación aún mayor que la irradiación del plásmido con UV, pero que la combinación de ambos tratamientos no produce un efecto aditivo, sino que el aumento en la transformación es aproximadamente el promedio entre los observados con cada tratamiento por separado. Estos resultados son observados en células capaces, o no, de reparar daño al ADN.

Expresión transitoria. El plásmido utilizado para estudiar el efecto del butirato de sodio sobre la expresión transitoria fue el pGA293 (Figura 8). El ADN del plásmido, irradiado o no,

Figura 13. Efecto del butirato de sodio sobre la actividad transformadora del plásmido pSV2-gpt. Las células HT-1080 (punteado) y XP12RO-SV40 (rayado) fueron transformadas con 1 μ g de pSV2-gpt por placa. El plásmido fue irradiado con 200 J/m² o no irradiado. Las células fueron tratadas o no con butirato de sodio durante 18 horas, y resembradas en medio selectivo a las 48 horas después de la transformación. La frecuencia de colonias Gpt⁺, relativa con respecto a la obtenida con plásmido y células no tratados para cada línea celular, fue calculada en base al número de células resembradas, para evitar errores debidos a la detención de la división celular causado por el butirato.

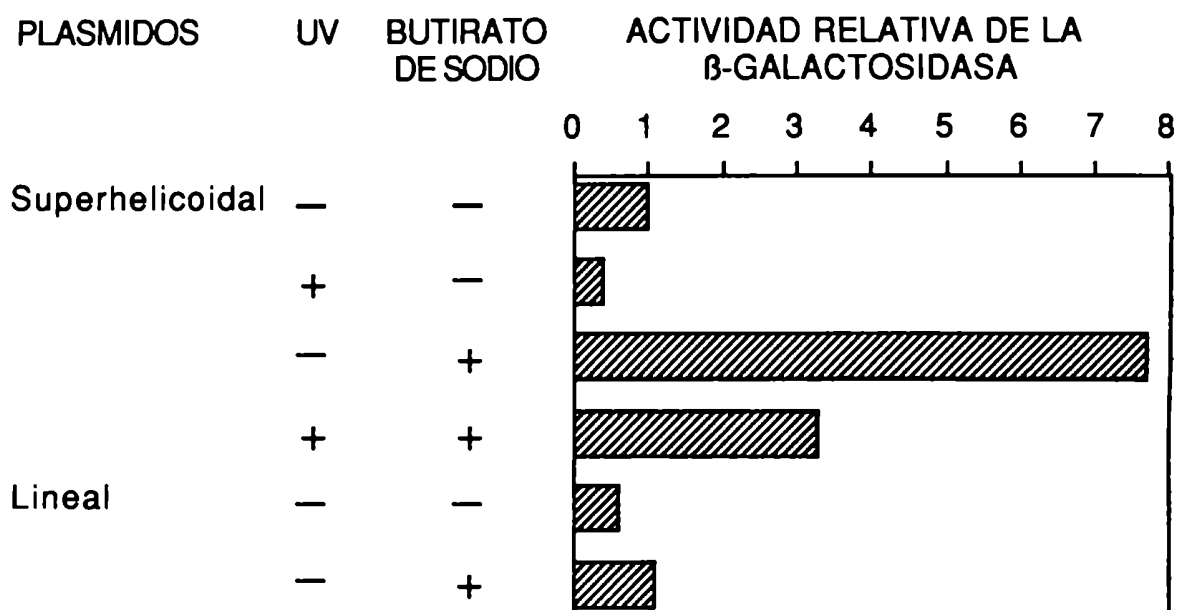


fue introducido en las células receptoras que fueron subsecuentemente tratadas, o no, con butirato de sodio como se describió en el párrafo anterior; ulteriormente las células fueron lisadas y los extractos fueron analizados para determinar la actividad de la β -galactosidasa. Cuando el plásmido era superhelicoidal el tratamiento con butirato de sodio produjo un incremento en la actividad de la β -galactosidasa de más de 7 veces, independientemente de que el plásmido fuera irradiado o no; el aumento no fue tan pronunciado (solo 2 veces) cuando el plásmido era lineal (Figura 14). La irradiación redujo la actividad de la enzima alrededor de un 50 % en células que habían sido tratadas, o no, con butirato de sodio. El efecto de cada uno de estos tratamientos sobre la expresión transitoria de *lacZ* (aumento con butirato de sodio, reducción con UV) no es modificado por la aplicación del otro; el hecho de que estos efectos sean opuestos indica que el mecanismo por el cual las lesiones producidas por la UV reducen la expresión, posiblemente porque resultan en bloqueos para la transcripción, no se relaciona en absoluto con el modo de acción del butirato de sodio, que posee una acción mejoradora probablemente a través de una interacción directa con el promotor de la transcripción del SV40 en el plásmido pGA293. El efecto del butirato es mucho menos pronunciado cuando el plásmido es lineal; esto explica los resultados de Lehmann y Oomen (1985), quienes establecieron que la actividad de la acetiltransferasa del cloranfenicol cuando el plásmido pSV2-*cat* es irradiado con UV o linealizado, es alrededor del 10 % de la del plásmido no tratado. En los experimentos de estos autores, todas las células receptoras fueron tratadas con butirato de sodio. En la presente Tesis se ha determinado que la diferencia entre las actividades de plásmidos superhelicoidales y lineales no es tan marcada en células no tratadas; es posible que el butirato de sodio actúe con preferencia sobre la cromatina superhelicoidal.

Efecto de lesiones causadas por agentes químicos

N-acetoxi-2-acetilaminofluoreno (NA-AAF). El ADN del pSV2-*gpt* fue tratado con concentraciones de NA-AAF de hasta 100 μ M, que produce alrededor de 300 lesiones por molécula de plásmido. Cuando el ADN tratado con el NA-AAF fue analizado mediante la

Figura 14. Efecto del butirato de sodio sobre la expresión transitoria de *lacZ* con el pGA293 irradiado o linealizado. Las células HT-1080 fueron transformadas con 1.3 μg de pGA293 sin tratar, irradiado con 400 J/m^2 o linealizado con *Bg*III. Luego del tratamiento con glicerol, las células fueron tratadas o no con butirato de sodio durante 18 horas, cosechadas 48 horas después de la transformación y analizadas para determinar la actividad de la β -galactosidasa, que es expresada en relación al valor obtenido con plásmido y células sin tratar.



cromatografía líquida de alta presión (HPLC), aparecieron 2 modificaciones principales, el *N*-(deoxiguanosin-8-il)-2-acetilaminofluoreno (dG-C8-AAF), y el 3-(deoxiguanosin-N²-il)-2-acetilaminofluoreno (dG-N²-AAF), en una proporción de 2 a 1 aproximadamente. En otros estudios se ha propuesto que el dG-C8-AAF causa una distorsión en la estructura helicoidal del ADN, mientras que el aducto en la posición N² de la guanina no produce cambios en la conformación del ADN (Grunberger y Weinstein, 1979). Es interesante notar que la primera lesión es reparada en células de mamíferos *in vivo*, mientras que la segunda lesión no es reparada (Kriek, 1972; Leadon y Hanawalt, 1984). Cuando el plásmido tratado con NA-AAF fue introducido en células HT-1080, se obtuvieron más colonias transformadas que con plásmido no tratado; este aumento dependió de la cantidad de lesiones en el ADN de los plásmidos (Figura 15). El incremento en la transformación se mantuvo por debajo del incremento obtenido con plásmidos que contenían un número equivalente de lesiones causadas por la radiación de 254 nm en los mismos experimentos (Tabla X). Cuando el plásmido fue tratado con UV y NA-AAF, el rendimiento de colonias Gpt⁺ fue menor que cuando el plásmido fue tratado con UV solamente (Tabla X).

4'-hidroximetil-4,5',8-trimetilpsoraleno (HMT). Los psoralenos se intercalan en el ADN y forman aductos covalentes con pirimidinas cuando la mezcla es expuesta a la UV cercana (360 nm). Estas sustancias poseen dos grupos reactivos, de manera que pueden formar aductos en una de las cadenas de ADN, o, cuando las condiciones son favorables, en ambas cadenas, creando entrecruzamientos intercatenarios. Cuando el plásmido pSV2-*gpt* fue tratado con HMT e iluminado con una dosis de UV cercana de alrededor de 6.000 J/m², la mayoría de las lesiones (94 %) fueron monoaductos; para producir más biaductos, el HMT libre fue eliminado mediante tres lavados consecutivos con buffer TE, y el ADN fue irradiado extensivamente con UV cercana (alrededor de 360.000 J/m²). Este segundo tratamiento convirtió todos los monoaductos entrecruzables en entrecruzamientos intercatenarios, o biaductos. El máximo que se puede obtener es de alrededor de 65 % del total de las lesiones (Vos, 1988). Ambos tipos de lesiones,

Figura 15. Efecto del NA-AAF sobre la actividad transformadora del plásmido pSV2-*gpt*. Las células HT-1080 fueron transformadas con 1 μ g por placa de pSV2-*gpt*, tratado *in vitro* con varias concentraciones de NA-AAF, o sin tratar. La frecuencia de colonias Gpt⁺ fue normalizada con respecto a la obtenida con pSV2-*gpt* no tratado. Los puntos representan datos de dos experimentos independientes.

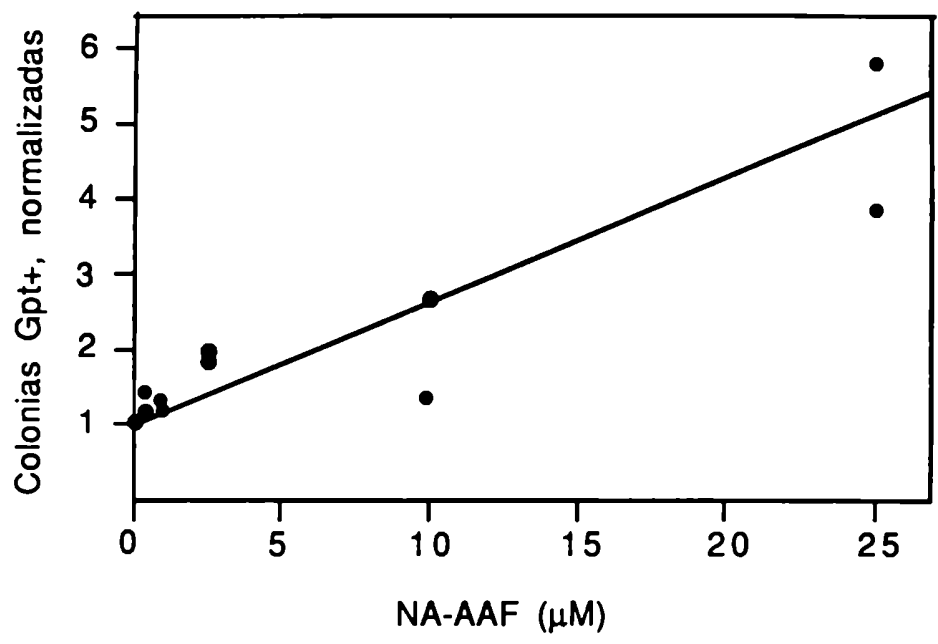


TABLA X

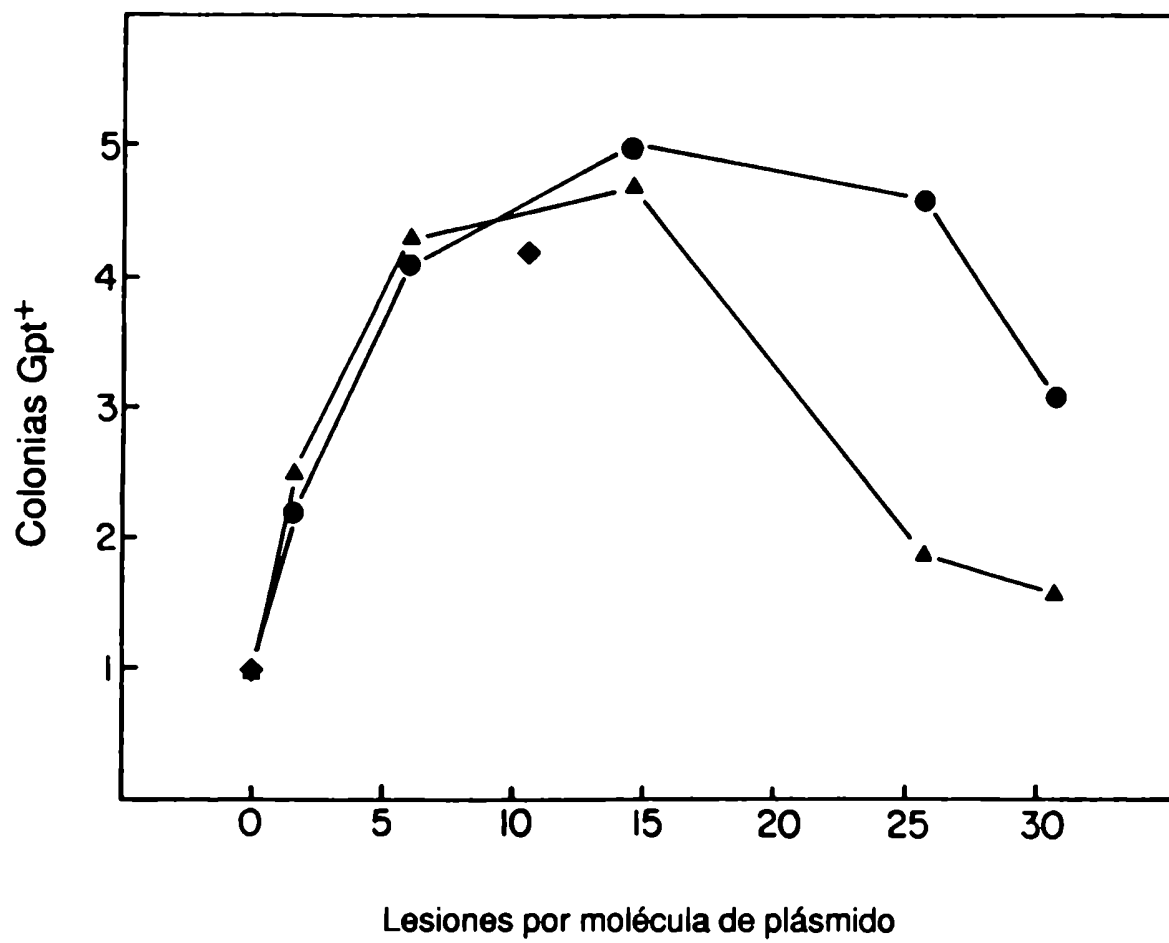
Efecto del tratamiento con NA-AAF sobre la actividad transformadora de pSV2-*gpt*

TRATAMIENTO	COLONIAS Gpt ⁺ /10 ⁵ CÉLULAS RECEPTORAS	
	EXP. 1	EXP. 2
No tratado	94 (1.0)	8 (1.0)
NA-AAF	146 (1.6)	27 (3.4)
UV	492 (5.2)	137 (17.1)
NA-AAF + UV	376 (4.0)	74 (9.3)

El plásmido pSV2-*gpt* fue no tratado, tratado con NA-AAF 10 μ M, que produjo 30 lesiones por molécula, o con 200 J/m² de UV de 254 nm que produjeron 14 dímeros de pirimidinas, o con ambos NA-AAF y UV, e introducido en células HT-1080. Los números entre paréntesis indican las frecuencias de la transformación obtenidas con plásmido tratado, relativas a las obtenidas con plásmido no tratado.

los mono y biaductos, causaron incrementos en la frecuencia de la transformación obtenida con pSV2-*gpt* tratado con HMT y UV cercana en dosis moderadas; estos incrementos son similares a los que ocurren cuando el ADN del pSV2-*gpt* contiene un número equivalente de lesiones causadas por la UV de 254 nm (Figura 16). Cuando el número de lesiones fue aumentado, el incremento en la frecuencia de la transformación se hizo menos evidente; comparando los datos de las figuras 3 y 16, se concluyó que el nivel de toxicidad de los entrecruzamientos intercatenarios es mayor que el de los monoadductos de psoralenos, y éstos a su vez son más tóxicos que los dímeros de pirimidinas.

Figura 16. Efecto de HMT y UV cercana sobre la actividad transformadora del plásmido pSV2-*gpt*. El ADN del plásmido fue no tratado, o irradiado con 150 J/m² de UV de 254 nm (rombo), o tratado con varias concentraciones de HMT y UV cercana (círculos, 94 % monoadductos). El HMT que no reaccionó fue eliminado de las muestras, las que fueron re-irradiadas con luz de 360 nm para aumentar la proporción de biadductos con respecto a los monoadductos (triángulos, 65 % biadductos). El número de adductos producidos fue calculado a partir de la cantidad de ³H-HMT ligado al ADN; la frecuencia de entrecruzamientos fue determinada mediante la electroforesis en geles de agarosa.



CAPÍTULO 5^a

FACTORES CELULARES QUE INFLUYEN EN LA ACTIVIDAD TRANSFORMADORA DE LOS PLÁSMIDOS pSV2.

Introducción

En los capítulos anteriores se analizó el efecto de las lesiones producidas por la luz UV sobre la frecuencia de la transformación de células humanas. En este capítulo se estudiarán ciertos factores que dependen de las propiedades genéticas de las células receptoras.

Se considerará la importancia de la presencia en las células de secuencias homólogas a secuencias en los plásmidos, que podría resultar en recombinaciones homólogas que aumentarían la frecuencia de moléculas de plásmidos integradas en el genoma celular.

Otro factor a tener en cuenta es la capacidad de las células de permitir la replicación de los virus que las infectan. En este sentido ciertas células son completamente permisivas para ciertos virus, permitiendo la expresión del genoma viral, la replicación del ADN viral, la producción de partículas virales y ulteriormente dando lugar a la muerte de las células infectadas. Por otro lado, las células no permisivas sobreviven la infección y no producen progenie viral; en ellas algunos genes virales son expresados por lo menos temporariamente. Una tercera clase de células son semipermisivas y poseen características mixtas. Por ejemplo las células humanas son semipermisivas para el SV40: las células sobreviven la infección aunque excretan pequeñas cantidades de partículas virales. La expresión de ciertos genes del virus produce cambios fenotípicos en las células huéspedes; en particular, aumenta la proporción de células que sufren una transformación morfológica. Por esta razón, la infección con el SV40 ha sido utilizada a menudo para inmortalizar cultivos primarios de células humanas.

La permisividad depende de factores codificados por las células, que son necesarios para la replicación de los virus. Los estudios de Wobbe et al. (1987) demostraron que la presencia del complejo ADN polimerasa α -primasa purificado de células permisivas o semipermisivas para el SV40 (humanas, simias) o el virus polioma (murinas) era necesaria para llevar a cabo la replicación *in vitro* de cada uno de esos virus; la interacción entre el complejo enzimático celular y el virus es altamente específica.

Los plásmidos pSV2 contienen secuencias del SV40: el origen de la replicación, el promotor temprano de la transcripción, y las señales para la poliadenilación y el empalme. El gen que codifica el antígeno T, necesario para la replicación viral, fue eliminado al construir el plásmido. Aún así, existe la posibilidad de que haya algún tipo de interacción entre el (los) factor(es) celular(es) que determinan la permisividad, y las secuencias del SV40 en los plásmidos pSV2.

Resultados.

Efecto de las secuencias homólogas

Se comparó el efecto de la irradiación ultravioleta del ADN de plásmidos pSV2-*gpt* sobre la transformación de varias líneas de células humanas (Tabla XI): 2 líneas normales con respecto a la reparación, HT-1080 y VA13, y 2 líneas con sistemas de reparación deficientes, ambas derivadas de pacientes con xeroderma pigmentosum grupo A, XP12RO-SV40 y XP12BE-SV40. En todas estas líneas, el ADN de plásmidos irradiados con 150 J/m^2 produjeron más colonias transformadas que ADN no irradiado. Las comparaciones cuantitativas entre distintas líneas son difíciles de hacer porque el monto del incremento varió entre experimentos; sin embargo, resultó claro que no hay diferencias cualitativas entre líneas eficientes y deficientes con respecto a la reparación. El ADN irradiado con 4.000 J/m^2 produjo menos colonias transformadas que cuando fue irradiado con 150 J/m^2 , o no irradiado; pero aún esta dosis alta de UV no reveló diferencias entre células con diferentes capacidades para reparar ADN (Figura 17).

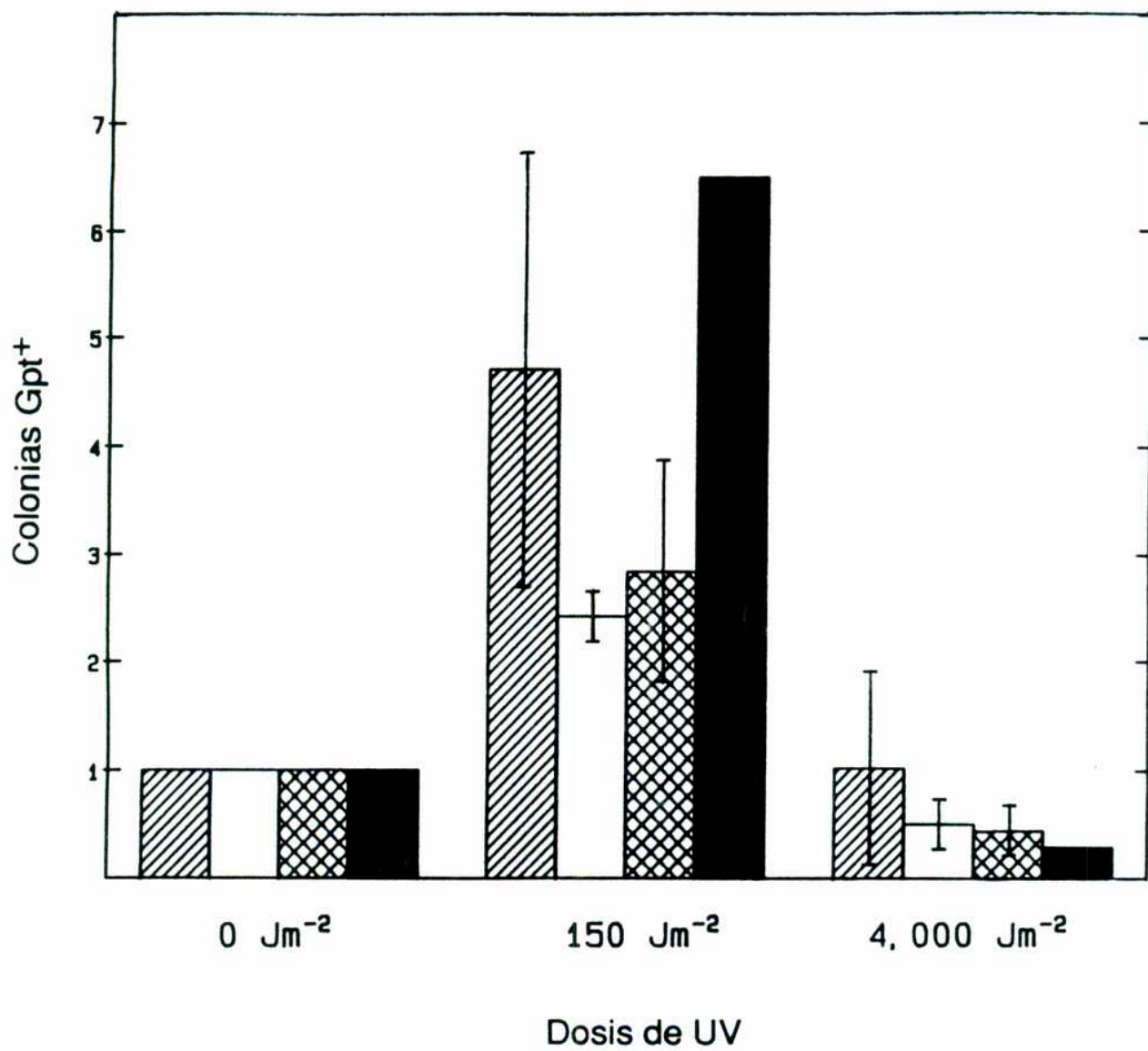
TABLA XI
Características de células de distintas especies

CÉLULAS	PERMISIVIDAD	REPARACIÓN	ORIGEN
<i>Humanas:</i>			
HT-1080	semi	+	ATCC CCL 121
VA13	semi	+	Smith y Hanawalt, 1976
XP12RO-SV40	semi		Kleijer et al, 1973
XP12BE-SV40	semi		GM4429B, NIGMS HMCR
<i>Simias:</i>			
BSC-1	permisivas	+	ATCC CCL 26
CV-1-P	permisivas	+	Dr. P. Berg*
<i>Murinas:</i>			
PG19	no		Jonasson et al. 1977
Ltk ⁻ aprt ⁻	no		Wigler et al. 1979
<i>Hámster:</i>			
CHO-K1	semi		Dr. R. T. Schimke*
V79	semi		Dr. A. A. van Zeeland§

*: Stanford University, Stanford, CA 94305 USA.

§: State University of Leiden, 2300 RA Leiden, The Netherlands.

Figura 17. Transformación de distintos tipos de células humanas con el plásmido pSV2-*gpt* irradiado con altas dosis de UV. La frecuencia de transformantes Gpt⁺ obtenida con el plásmido irradiado con las dosis de UV indicadas fue normalizada con relación a la obtenida con plásmido sin irradiar para cada una de las líneas celulares: HT-1080 (rayado), VA13 (blanco), XP12RO-SV40 (cruzado) y XP12BE-SV40 (negro). Las columnas representan el promedio de dos experimentos independientes, excepto para XP12BE-SV40 que fue utilizada en un solo experimento; el error standard está indicado.



Todas las células humanas utilizadas fueron transformadas con SV40 para inmortalizarlas, excepto HT-1080, que proviene de un fibrosarcoma. Los resultados en la figura 17 indican que la presencia o ausencia de secuencias de SV40 en las células receptoras, homólogas a las que se encuentran en los plásmidos pSV2, no influyen la frecuencia de la transformación.

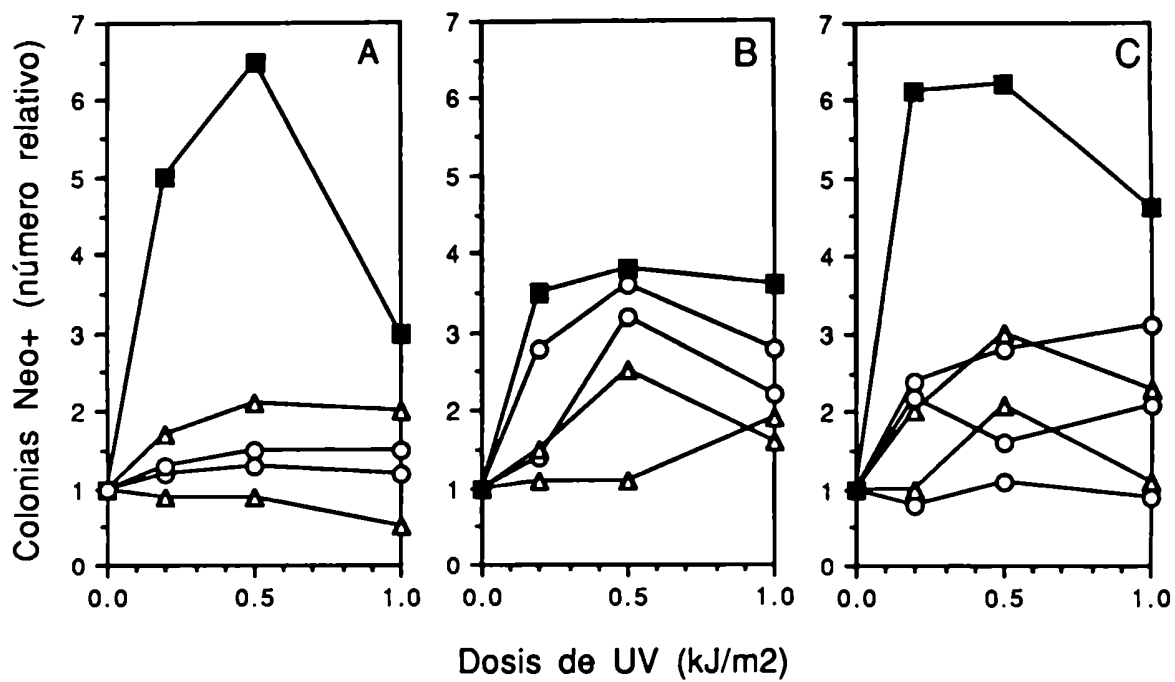
Efecto de la permisividad

Sobre esta base se decidió estudiar las células con distintas características respecto a su permisividad para el SV40 y a su capacidad de reparación del daño al ADN. Se utilizaron células de roedores, que sobreviven la irradiación con UV como las células humanas, aunque son mucho menos eficientes para escindir dímeros de pirimidinas (Ganesan et al, 1983). Recientemente fue demostrado en este laboratorio que estas células reparan dímeros preferentemente en los genes activos (Bohr et al, 1986; Madhani et al, 1986) y que la cadena de ADN que es transcripta es reparada mucho más eficientemente que la cadena complementaria (Mellon et al, 1987). También se estudiaron células de mono, que son permisivas para el SV40, y que poseen un sistema de reparación muy similar al de las células humanas (Tabla XI).

Los resultados obtenidos (Figura 18) indican que ni la permisividad para el SV40, ni la capacidad de reparar o sobrevivir al daño ultravioleta al ADN, ni la especie de origen de las células son factores que influyen en la respuesta de las mismas a la irradiación de pSV2-*neo*; las variaciones observadas parecen depender de la línea celular utilizada.

Nairn et al. (1988a) obtuvieron resultados similares a los nuestros con células de ovario de hámster chino (CHO) resistentes (UV^R) o sensibles (UV^S) a la radiación UV, cuando fueron transformadas con pSV2-*gpt*. Es interesante notar que cuando utilizaron el plásmido pHprt-1 que contiene un fragmento del gen de la fosforibosiltransferasa de la adenina (*APRT*) de hamster, y que no contiene secuencias del SV40, las células UV^R exhibieron la misma respuesta que con pSV2-*gpt*, pero las células UV^S sufrieron una *reducción* en la frecuencia de la

Figura 18. Efecto de la irradiación del plásmido pSV2-neo sobre la transformación de células de distintas especies. El ADN del plásmido fue irradiado con las dosis de UV indicadas, y luego introducido en células de mamíferos mediante la coprecipitación con fosfato de calcio. Las células humanas HT-1080 (cuadrados) fueron transformadas al mismo tiempo que las células de hámster (A: triángulos, CHO-K1; círculos, V-79); de ratón (B: triángulos, PG19; círculos, Ltk⁻aprt⁻); y de mono (C: triángulos, BSC-1; círculos, CV-1-P)



transformación cuando el plásmido había sido irradiado. Estos autores sugirieron que las secuencias del SV40 en pSV2 pueden potenciar la recombinación, quizá a través de la interacción con factores atraídos por la presencia del daño en el ADN del plásmido.

Estos autores también utilizaron el plásmido pX1, que contiene secuencias del gen que codifica la quinasa de timidina (TK) del virus herpes simplex tipo I, y que tampoco contiene secuencias del SV40, para transformar células TK⁻ derivadas de las líneas de CHO resistentes y sensibles a la UV (Nairn et al, 1988b). La eficiencia de la transformación obtenida corroboró los resultados obtenidos con pHprt-1. Cuando las células fueron cotransformadas con una mezcla de dos plásmidos derivados de pX1 que contenían mutaciones distintas en el gen TK, la eficiencia se redujo 1.000 veces; pero si los plásmidos eran irradiados con dosis moderadas de UV, se producía un aumento en la transformación en todas las líneas celulares utilizadas, independientemente de su capacidad de reparar dímeros de pirimidinas. Con dosis mayores de 250 J/m² la transformación se redujo, y esta reducción fue más marcada en las células UV^S que en las UV^R. Estos resultados sugieren que la recombinación entre plásmidos dañados puede jugar un papel importante en el aumento de la transformación, y que la capacidad de recombinar el ADN de plásmidos no se relaciona con la capacidad de reparar el daño ultravioleta en estas células; la diferencia observada con dosis altas de UV probablemente refleja un límite en el número de lesiones que la maquinaria de la recombinación puede manejar eficientemente.

CONCLUSIÓN

La irradiación de plásmidos quiméricos con dosis bajas de UV produce un incremento en la actividad transformadora de los plásmidos en células humanas. Este incremento en transformación depende de ciertas alteraciones producidas en el ADN del plásmido por la irradiación, ya que no afecta la actividad de plásmidos no irradiados introducidos en las células al mismo tiempo que plásmidos irradiados. El mecanismo por el cual las lesiones producidas por la UV aumentan la transformación no se conoce. La proporción de colonias transformadas obtenidas con plásmido irradiado o no irradiado se mantiene casi constante, independientemente de la concentración de ADN utilizada para la transformación; esto elimina la posibilidad de un efecto de reactivación de multiplicidad. Ni la conversión de plásmidos superhelicoidales a la forma lineal, ni la eliminación de secuencias deletéreas, como tampoco la eliminación de ADN "carrier" o de ARN en la preparación de ADN de plásmido, afectan el incremento en transformación causado por la UV.

En procariontes, la irradiación con UV no aumenta la capacidad de los virus bacterianos de formar placas (Defais et al, 1983; Harm, 1963) o su actividad transformadora en bacterias (Mizusawa et al, 1981; Schmid et al, 1982); por el contrario, la actividad biológica de estos virus se reduce; además, esta reducción es más acentuada en huéspedes con una capacidad reducida de reparar daño en el ADN. En eucariontes, el efecto de la UV depende del parámetro que se tenga en consideración. En estudios de la supervivencia del virus SV40 en células humanas o de simios, medida como la capacidad de formar placas, la infectividad del SV40 no aumenta con ninguna de las dosis de UV utilizadas, y es reducida cuando la dosis alcanza a 2.500 J/m^2 ; además, la supervivencia de estos virus es menor en células de XP que en células con un sistema de reparación intacto, ya sea humanas o de simios (Abrahams y van der Eb, 1976; Seemayer y Defendi, 1973). Esta diferencia en supervivencia ha sido atribuida a la incapacidad de las

células de XP de escindir dímeros de pirimidina. Por otro lado, Seemayer y Defendi (1973) demostraron que la frecuencia de la transformación oncogénica de células de hamster con el SV40 aumenta cuando el virus es irradiado con 500-1.000 J/m². Un efecto similar sobre la transformación morfológica ha sido descrita en células de XP variante aunque no fue observada en células de XP-A o normales (Hall y Tokuno, 1979). Estos resultados son cualitativamente similares a los nuestros, aunque presentan algunas diferencias que dependen de las células utilizadas como receptoras. La transformación estable de células, ya sea por virus o plásmidos no replicativos, requiere la integración del ADN exógeno en el genoma celular. Las diferencias que presentan distintos tipos de células en la eficiencia con que son transformadas por virus o plásmidos irradiados o no, pueden ser una indicación de las diferencias en los procesos celulares que pueden afectar al ADN exógeno antes o durante la integración.

La capacidad de las células receptoras de reparar dímeros de pirimidina no influye en los resultados obtenidos: cuando se compararon células humanas con sistemas de reparación de distinta capacidad, no se encontró una correlación entre la eficiencia con que las células reparan el daño en su ADN y el aumento en la transformación obtenido con plásmidos irradiados con UV. En todas las células humanas utilizadas, el plásmido pSV2-*gpt* irradiado con dosis de UV de hasta 500 J/m² produjo más transformantes Gpt⁺ que el plásmido sin irradiar. Barbis et al (1986) obtuvieron resultados similares con células de xeroderma pigmentosum grupo G y variante.

La especie de origen o la permisividad para el SV40 de las células receptoras no parecen ser factores que afecten el aumento en la transformación; ciertas líneas celulares de roedores exhiben una respuesta disminuida, que puede resultar de una saturación del sistema, ya que estas células tienden a integrar mucho más ADN que las células de primates, y su frecuencia de transformación es más elevada (Lehman, 1985; van Duin et al, 1985).

Dentro de la gama de las dosis de UV utilizadas en estos experimentos, el producto principal de la irradiación es el dímero ciclobutano de pirimidinas; otras lesiones son producidas en menor proporción, pero también pueden ser responsables por el efecto observado. En células humanas, el incremento en la actividad transformadora causado por la irradiación del plásmido pSV2-*gpt* con dosis moderadas de UV es debido principalmente a los dímeros de pirimidinas. La fotorreactivación, que elimina específicamente esas lesiones, redujo la actividad transformadora de pSV2-*gpt* irradiado con UV en células capaces o incapaces de reparar dímeros de pirimidinas. Utilizando distintos plásmidos, van Duin et al (1985) obtuvieron resultados similares. Además, se observó que los dímeros de timina producidos por irradiación con UV de 313 nm en condiciones fotosensibilizantes incrementaron la actividad transformadora de pSV2-*gpt* tan efectivamente como un número equivalente de dímeros de pirimidinas producidos por irradiación con UV de 254 nm.

El efecto de los dímeros de pirimidinas sobre la actividad transformadora de pSV2-*gpt* persistió incluso después del tratamiento con la endonucleasa V de T4, que corta al ADN entre un dímero y la base vecina, pero no elimina la lesión. Ni los sitiosapurínicos, ni los cortes de cadena simple producidos por esta enzima afectaron el incremento en la actividad transformadora causada por los dímeros. El conjunto de resultados presentados apoya la idea de que los dímeros de pirimidinas son necesarios para producir un aumento en la transformación, ya que su reparación (fotorreactivación) elimina el efecto de la UV sobre la frecuencia de colonias transformantes obtenida.

Ninguna de las otras lesiones estudiadas, producidas directa o indirectamente por la UV, que incluyen los glicoles de timina y los sitiosapurínicos, aumentaron la frecuencia de la transformación de células HT-1080. Recientemente, otra lesión causada por la UV, el fotoproducto (6-4), que afecta pares de pirimidinas en la misma cadena de ADN, ha despertado el interés de varios grupos de investigadores con respecto a su reparación y a sus efectos sobre

la mutación y la supervivencia. La frecuencia de esta lesión es mucho menor que la de los dímeros ciclobutanos de pirimidinas (Mitchell, 1988). El estudio de este tipo de lesión es difícil debido a que no se dispone de un método específico para crearla o para detectarla sin que ocurran lesiones y/o actividades contaminantes.

Aunque dosis moderadas de UV aumentan la transformación, dosis altas pueden reducirla. En las condiciones aquí descritas, el nivel de dímeros de pirimidinas en pSV2-*gpt* irradiado alcanzó un plateau con dosis de 4.000 J/m² o mayores, mientras que otras lesiones, incluyendo los entrecruzamientos intercatenarios, continuaron acumulándose. Entre las lesiones producidas con UV, no se ha podido identificar ninguna que especialmente disminuya la capacidad de transformación. Por ejemplo los glicoles de timina producidos mediante el tratamiento con OsO₄ fueron inocuos aún a niveles más altos que los alcanzados en ADN irradiado con UV. Los entrecruzamientos intercatenarios no pudieron ser probados por separado de otras lesiones; sin embargo, por analogía con los entrecruzamientos causados por los psoralenos, pueden tener un efecto similar al de los dímeros de pirimidinas: aumentar la transformación cuando el número de lesiones es moderado, y reducirla cuando la dosis aumenta.

En experimentos en los que el plásmido pSV2-*gpt* fue reconstruido a partir de fragmentos que habían sido irradiados o no separadamente, se ha determinado que la presencia de lesiones en el fragmento que contiene la unidad de transcripción del gen *gpt* decreció la actividad transformadora del plásmido, mientras que las lesiones fuera de las secuencias necesarias para expresar *gpt* aumentaron la transformación mucho más que el daño distribuido a lo largo de todo el plásmido (Spivak et al, 1987). Los plásmidos reconstruidos y linealizados de manera que las secuencias que contenían lesiones estaban localizadas antes, después o a ambos lados de la unidad de transcripción de *gpt*, presentaron el mismo incremento en su actividad transformadora, que fue independiente de la localización de las secuencias activas e inactivas respectivamente (Leadon et al, 1987). Por lo tanto, el efecto del daño al ADN sobre la actividad

transformadora de los plásmidos depende no solamente de la naturaleza del daño, sino también de que su localización sea dentro o fuera de la unidad de transcripción del gen cuya expresión es necesaria para la supervivencia de las células huéspedes en el medio selectivo.

Se analizó además la posibilidad de que el daño en los plásmidos cause un aumento en la actividad de las enzimas codificadas por ellos, ya sea debido a un aumento a nivel de la expresión de los genes, o a un número mayor de moléculas de plásmidos absorbidas o activadas en las células receptoras.

En todas las células humanas utilizadas, el plásmido pSV2-*gpt* irradiado con dosis de UV de hasta 500 J/m² produjo más transformantes Gpt⁺ que el plásmido sin irradiar. Estos resultados contrastan con aquellos obtenidos de experimentos en los que se midió la expresión transitoria, la cual es disminuida por la irradiación. Esta disminución es más pronunciada en células de XP que en células con reparación eficiente (Lehman y Oomen, 1985; Protic-Sabljić y Kraemer, 1985; Spivak et al, 1988). Estos resultados indican que la expresión transitoria de los plásmidos irradiados puede ser reactivada por la reparación del daño en las células receptoras, presumiblemente por la eliminación de las lesiones que bloquean la transcripción. El nivel de la expresión transitoria, sin embargo, no se relaciona directamente con el incremento en la frecuencia de colonias transformantes que observamos cuando el plásmido es irradiado. Se concluye por lo tanto que estas dos actividades son llevadas a cabo mediante procesos independientes.

El butirato de sodio parece ejercer un efecto general sobre células en cultivo, induciendo una variedad de fenómenos. La expresión transitoria y la integración estable de plásmidos son ambas aumentadas en células tratadas con esta droga; es posible que el aumento en la expresión ayude de alguna manera a las células a integrar el ADN de los plásmidos, quizá en regiones más activas de la cromatina, ya que existe evidencia de que el butirato interactúa específicamente

con ciertos promotores de la transcripción (Gorman et al, 1983).

Se determinó además que el efecto de la UV sobre la transformación estable es similar al efecto del butirato, pero que estos efectos no son aditivos. Por otro lado, el efecto de la UV sobre la expresión transitoria es diametralmente opuesto al efecto del butirato; esta conclusión indica que los mecanismos de acción de la UV y del butirato son diferentes, eliminando la posibilidad de establecer analogías entre ambos tratamientos.

La influencia de las secuencias homólogas en los plásmidos y en las células receptoras fue considerada para explicar el aumento en la frecuencia de la transformación. Los plásmidos pSV2-*gpt* y pSV2-*neo* contienen aproximadamente 1,9 kbp de secuencias del SV40 (Figura 2). Sin embargo, la frecuencia de transformantes Gpt⁺ o Neo⁺ no fue más alta en las células VA13, XP12RO o XP12BE, que fueron transformadas con el SV40, que en las HT-1080, que no contienen secuencias del SV40 en su ADN. Estos resultados son consistentes con la idea de que la integración de plásmidos irradiados o no, generalmente involucra un proceso de recombinación no homóloga, o ilegítima. Van Duin et al (1985) llegaron a una conclusión similar, utilizando plásmidos que contenían secuencias Alu o del SV40; esos plásmidos presentan una actividad transformadora mayor cuando son irradiados, independientemente de que posean, o no, secuencias homólogas a las presentes en el genoma de las células receptoras.

Recientemente, Nairn et al (1988b) han demostrado que la transformación aumenta cuando los plásmidos que contienen secuencias mutadas en distintas regiones del gen TK son irradiados con UV e introducidos en células de hamster chino. Es posible que la recombinación entre plásmidos dañados, homóloga o no, ayude a incrementar la transformación; pero la recombinación homóloga entre secuencias de plásmidos y genómicas es demasiado infrecuente como para ser considerada de importancia.

El incremento en la actividad transformadora causado por la irradiación de los plásmidos pSV2 con UV de 254 nm parece ser debido principalmente a los dímeros de pirimidinas. El tratamiento de pSV2-*gpt* con el psoraleno HMT produjo una respuesta similar a la de UV, ya fuera que el ADN de los plásmidos contuviera una mayoría de monoadductos, o de biadductos que causan entrecruzamientos intercatenarios. Las lesiones causadas debido al tratamiento del plásmido con NA-AAF también aumentaron la transformación, pero no tanto como los dímeros de pirimidinas; además, NA-AAF redujo la actividad transformadora de pSV2-*gpt* irradiado con UV. Estos resultados indican que el aumento en la frecuencia de la transformación no es sólo una respuesta general a la presencia de lesiones voluminosas en el ADN de los plásmidos, sino que depende de la naturaleza de cada lesión en particular.

El método utilizado para introducir ADN plásmídico en células permite que la mayoría de las células tratadas incorporen dicho ADN, por lo menos en el caso de las células Ltk de ratón. Sin embargo, menos del 10 % de las células son capaces de expresar la información genética contenida en los plásmidos, y esta capacidad de expresión desaparece casi por completo después de pocos días (Loyter et al, 1982). En algunos casos, esto se debe a la degradación o pérdida de los plásmidos; en otros casos puede resultar de la expresión defectuosa de los genes integrados en el genoma que entonces no confieren resistencia al medio selectivo.

La hipótesis desarrollada en esta Tesis es que los plásmidos irradiados son integrados más eficientemente en el genoma de las células receptoras; una teoría similar fue postulada para explicar el efecto recombinogénico de la UV sobre el bacteriófago lambda (Hays y Boehmer, 1978; Jacob y Wollman, 1955; Lin y Howard-Flanders, 1976) y SV40 (Dubbs et al, 1974).

La hipótesis de que la integración sea el paso crítico en el estudio del aumento en la transformación fue analizada por J-M. Vos en nuestro laboratorio (Vos y Hanawalt, 1989). Utilizando plásmidos quiméricos derivados del virus de Epstein-Barr que son o no capaces de

replicar su ADN en forma autónoma dentro de las células huéspedes, este autor determinó que sólo los plásmidos integrativos presentan el aumento en su actividad transformadora cuando son irradiados.

Existen varios mecanismos mediante los cuales las lesiones presentes en el ADN de plásmidos dañados pueden influir la integración:

(1) El número de células transformadas que sobreviven la selección podría ser aumentado si las lesiones en el ADN de los plásmidos aumentaran *el número de moléculas integradas* en el genoma de las células receptoras, una idea que fue estudiada por varios grupos (van Duin, 1985; Postel, 1985) quienes determinaron mediante Southern blots que el número de copias de plásmidos integrados no variaba significativamente si el ADN de los plásmidos era irradiado o no.

(2) Los procesos que son afectados dentro de las células receptoras cuando son transformadas con plásmido dañado, pueden incluir la recombinación, resultando en un aumento en *el número de células con por lo menos una copia integrada* en el ADN genómico, explicando así el incremento en transformación.

(a) Existe evidencia de que plásmidos irradiados son recombinados entre sí (Nairn et al, 1988b); las estructuras resultantes (dímeros, concatémicos, etc.) podrían ser integradas más eficientemente.

(b) La recombinación podría ocurrir directamente entre la secuencia del plásmido que contiene un dímero y el ADN cromosómico, o indirectamente, quizá facilitada por una proteína que reconocería la lesión en el plásmido, y que sería, a su vez, el sustrato de otra enzima que llevaría a cabo la recombinación.

(3) La presencia de daño en el ADN de los plásmidos podría causar una *asociación con regiones especiales de la cromatina celular*, por ejemplo con secuencias más receptivas a la recombinación, probablemente mediada por enzimas que reconocerían las lesiones específicamente. Estas regiones podrían a su vez ser sitios activos del ADN celular en los que la

expresión de los genes contenidos en el plásmido tendría mejores posibilidades de ser productiva. Estudios realizados con retrovirus indican que las regiones de la cromatina que son más propensas a integrar ADN foráneo son más sensibles a la digestión por la nucleasa S_1 , una indicación de su estado activo (Barklis et al, 1986; Conklin y Groundine, 1986).

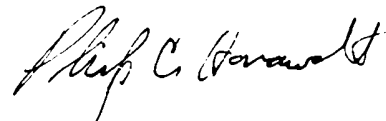
Los estudios sobre la interacción entre los efectos del daño al ADN de virus oncogénicos y la transformación celular que conduce a la formación de tumores no han rendido resultados definitivos. Las contradicciones aparentes pueden ser debidas a que la mayoría de los vectores utilizados son del tipo no-integrativo (episómico), que no manifiestan un aumento en su actividad transformadora cuando son dañados; los resultados presentados aquí deberán ser tenidos en cuenta para llevar a cabo ese tipo de análisis en el futuro.

Los resultados aquí expuestos ofrecen una aplicación práctica inmediata: la de aumentar la eficiencia con que ciertas células pueden ser transformadas, por ejemplo las células derivadas de pacientes con anemia de Fanconi han sido co-transformadas con ADN de células humanas normales y con un marcador genético (*gpt*) más eficientemente cuando el ADN transformante fue irradiado (Moustacchi et al, 1989).




Graciela Spivak

Doctorando



Dr. Philip C. Hanawalt

Director de Tesis



Dr. Héctor N. Torres

Codirector de Tesis

REFERENCIAS

- Abrahams, P. J. and A. J. van der Eb (1976) Host-cell reactivation of ultraviolet-irradiated SV40 DNA in five complementation groups of xeroderma pigmentosum. *Mutat. Res.* 35, 13-22.
- An, G., K. Hidaka and L. Siminovitch (1982) Expression of bacterial β -galactosidase in animal cells. *Mol. Cell. Biol.* 2, 1628-1632.
- Bachmann, B. (1972) Pedigrees of some mutant strains of *E. coli* K-12. *Bacteriol. Revs.* 36, 525-557.
- Barbis, D.P., R. A. Schultz and E. C. Friedberg (1986) Isolation and partial characterization of virus-transformed cell lines representing the A, G and variant complementation groups of XP. *Mutat. Res.* 165, 175-184.
- Barklis, E, R. C. Mulligan and R. Jaenish (1986) Chromosomal position or virus mutation permits retroviral expression in embryonal carcinoma cells. *Cell* 47, 391-399.
- Blair, D. G., D. J. Sherrat, D. B. Clewell and D. R. Helinski (1972) Isolation of supercoiled colicinogenic factor E1 DNA sensitive to ribonuclease and alkali. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 2518-2522.
- Bohr, V. A., D. S. Okumoto and P. C. Hanawalt (1986) Survival of UV-irradiated mammalian cells correlates with efficient DNA repair in an essential gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 3830-3833.
- Bootsma, D. (1978) Xeroderma pigmentosum, in P. C. Hanawalt, E. C. Friedberg and C. F. Fox (Eds.), *DNA Repair Mechanisms*, Academic Press, New York, p. 589.
- Brash, D. E. and W. A. Haseltine (1982) UV-induced mutation hotspots occur at DNA damage hotspots. *Nature* 298, 189-192.
- Breimer, L. H. and T. Lindahl (1984) DNA glycosylase activities for thymine residues damaged by ring saturation, fragmentation, or ring contraction are functions of endonuclease III in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 259, 5543-5548.

- Brunk, C. F., K. C. Jones and T. W. James (1979) Assay for nanogram quantities of DNA in cellular homogenates. *Anal. Biochem.* 92, 497-500.
- Canaani, D. and P. Berg (1982) Regulated expression of human interferon beta 1 gene after transduction into cultured mouse and rabbit cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 5166-5170.
- Cesarone, C. F., C. Bolognesi and L. Santi (1979) Improved microfluorometric DNA determination in biological material using 33258 Hoescht. *Anal. Biochem.* 100, 188-197.
- Conklin, K. F. and N. Groundine (1986) Varied interactions between provirus and adjacent host chromatin. *Mol. Cell. Biol.* 6, 3999-4007.
- Debenham P. G. and M. B. T. Webb (1984) The effect of X-rays and ultraviolet light on DNA-mediated gene transfer in mammalian cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 46, 555-568.
- Defais, M., P. C. Hanawalt and A. R. Sarasin (1983) Viral probes for DNA repair. *Adv. in Radiat. Biol.* 10, 1-37.
- Dubbs, D. R., M. Rachmeler and S. Kit (1974) Recombination between temperature-sensitive mutants of simian virus 40. *Virology* 57, 161-174.
- Eker, A. P. M. (1980) Photoreactivating enzyme from *Streptomyces griseus* - III. Evidence for the presence of an intrinsic chromophore. *Photochem. Photobiol.* 32, 593-600.
- Eker, A. P. M. and M. J. Fichtinger-Schepman (1975) Studies on a DNA photoreactivating enzyme from *Streptomyces griseus*. *Biochim. Biophys. Acta* 378, 54-63.
- Folger, K. R., E. A. Wong, G. Wahl and M. R. Capecchi (1982) Patterns of integration of DNA microinjected into cultured mammalian cells: evidence for homologous recombination between injected plasmid DNA molecules. *Mol. Cell. Biol.* 2, 1372-1387.
- Friedberg, E. C. and J. J. King (1971) Dark repair of ultraviolet-irradiated deoxyribonucleic acid by bacteriophage T4: purification and characterization of a dimer-specific phage-induced endonuclease. *J. Bact.* 106, 500-507.
- Friedberg, E. C. (1972) Studies on the substrate specificity of the T4 excision repair endonuclease. *Mutat. Res.* 15, 113-123.

- Ganesan, A. K., G. Spivak and P. C. Hanawalt (1983) Expression of DNA repair genes in mammalian cells, in: P. Nagley, A. W. Linnane, W. J. Peacock and J. A. Pateman (Eds.), *Manipulation and Expression of Genes in Eukaryotes*, Academic Press, Sidney, Australia, pp. 45-54.
- Ganesan, A. K. and G. Spivak (1987) Use of shuttle vectors for analysis of DNA damage processing in mammalian cells, in: E. C. Friedberg and P. C. Hanawalt (Eds.), *DNA Repair: A Laboratory Manual of Research Procedures*, vol. III, Marcel Dekker, New York, pp. 295-308.
- Glisin, V. R. and P. Doty (1967) The crosslinking of DNA by ultraviolet irradiation. *Biochim. Biophys. Acta* 142, 314-322.
- Gordon, L. K. and W. A. Haseltine (1980) Comparison of the cleavage of pyrimidine dimers by the bacteriophage T4 and *Micrococcus luteus* UV-specific endonucleases. *J. Biol. Chem.* 255, 12047-12050.
- Gorman, C. M., B. H. Howard and R. Reeves (1983) Expression of recombinant plasmids in mammalian cells is enhanced by sodium butyrate. *Nucl. Acids Res.* 11, 7631-7648.
- Graham, R. and A. van der Eb (1973) A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52, 456-467.
- Grunberger, D and I. B. Weinstein (1979) Conformational changes in nucleic acids modified by chemical carcinogens, in: P. L. Grover (Ed.), *Chemical Carcinogens and DNA* , vol. II, CRC Press, pp. 59-93.
- Hall, J. D. and S. Tokuno (1979) Enhanced transformation of xeroderma pigmentosum variant cells by ultraviolet light-irradiated simian virus 40. *Cancer Res.* 39, 4064-4068.
- Hanawalt, P. C., P. K. Cooper, A. K. Ganesan and C. A. Smith (1979) DNA repair in bacteria and in mammalian cells. *Ann. Rev. Biochem.* 48, 783-836.
- Hanawalt, P. C. and A. Sarasin (1986) Cancer-prone hereditary diseases with DNA processing abnormalities. *Trends in Genetics* 2, 124-129.
- Hariharan, P. V. and P. A. Cerutti (1974) Excision of damaged thymine residues from

- gamma-irradiated poly(dA-dT) by crude extracts of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 3532-3536.
- Hariharan, P. V. and P. A. Cerutti (1977) Formation of products of the 5,6-dihydroxydihydro-thymine type by ultraviolet light in HeLa cells. Biochem. 16, 2791-2795.
- Harm, W (1963) Repair of lethal ultraviolet damage in phage DNA, in F. H. Sobels (Ed.), Repair from genetic radiation damage, The Macmillan Co., New York, pp. 107-118.
- Hays, J. B. and S. Boehmer (1978) Antagonists of DNA gyrase inhibit repair and recombination of UV-irradiated phage λ . Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 4125-4129.
- Hughes, S. H., P. R. Shank, D. H. Spector, H-J. Kung, J. M. Bishop and H. E. Varmus (1978) Proviruses of avian sarcoma virus are terminally redundant, co-extensive with integrated linear DNA and integrated at many sites. Cell 15, 1397-1410.
- Ikenaga, M. and J. Jagger (1971) Photoreactivation of killing in *Streptomyces*-II. Kinetics of formation and photolysis of pyrimidine dimers and adducts in *S. coelicolor* and *S. griseus* PHR-1. Photochem. Photobiol. 13, 459-471.
- Jacob, F. and E. L. Wollman (1955) Etude genetique d'un bacteriophage temperé d'*Escherichia coli*. III Effet du rayonnement ultraviolet sur la recombinaison genetique. Ann. Inst. Pasteur (Paris) 88, 726-749.
- Jonasson, J., S. Povey and H. Harris (1977) The analysis of malignancy by cell fusion. VII: cytogenetic analysis of hybrids between malignant and diploid cells and of tumours derived from them. J. Cell Sci. 24, 217-254.
- Katcher, H. L. and S. S. Wallace (1983) Characterization of the *Escherichia coli* X-ray endonuclease, endonuclease III. Biochem. 22, 4071-4081.
- Kleijer, W. J., A. de Weerd-Kastelein, M. L. Sluyter, W. Keijzer, J. de Wit and D. Bootsma (1973) UV-induced DNA repair synthesis in cells of patients with different forms of xeroderma pigmentosum and of heterozygotes. Mutat. Res. 20, 417-428.
- Kriek, E. (1972) Persistent binding of a new reaction product of the carcinogen

- N*-hydroxy-*N*-2-acetylaminofluorene with guanine in rat liver DNA *in vivo*. *Cancer Res.* 32, 2042-2048.
- Lam, L. H. and R. J. Reynolds (1986a) UV-induced, bifilar enzyme-sensitive sites are indicative of closely opposed pyrimidine dimers. *Biophys. J.* 50, 307-317.
- Lam, L. H. and R. J. Reynolds (1986b) A sensitive, enzymatic assay for the detection of closely opposed cyclobutyl pyrimidine dimers induced in human diploid fibroblasts. *Mutat. Res.* 166, 187-198.
- Leadon, S. A. and P. C. Hanawalt (1983) Monoclonal antibody to DNA containing thymine glycol. *Mutat. Res.* 112, 191-200.
- Leadon, S. A. and P. C. Hanawalt (1984) Ultraviolet irradiation of monkey cells enhances the repair of DNA adducts in α DNA. *Carcinogenesis* 5, 1505-1510.
- Leadon, S. A., A. K. Ganesan and P. C. Hanawalt (1987) Enhanced transforming activity of ultraviolet-irradiated pSV2-*gpt* is due to damage outside the *gpt* transcription unit. *Plasmid* 18, 135-141.
- Lehmann, A. (1974) Postreplication repair of DNA in UV-irradiated mammalian cells, in P. C. Hanawalt and R. B. Setlow (Eds.), *Molecular Mechanisms for Repair of DNA*, Plenum Press, New York, pp. 617-623.
- Lehmann, A. R. (1985) Use of recombinant DNA techniques in cloning DNA repair genes and in the study of mutagenesis in mammalian cells. *Mutat. Res.* 150, 61-67.
- Lehmann, A. R. and A. Oomen (1985) Effect of DNA damage on the expression of the chloramphenicol acetyltransferase gene after transfection into diploid human fibroblasts. *Nucl. Acids Res.* 13, 2087-2095.
- Lin, P-F. and P. Howard-Flanders (1976) Genetic exchanges caused by ultraviolet photoproducts in phage lambda DNA molecules: the role of DNA replication. *Mol. Gen. Genet.* 146, 107-115.
- Lindahl, T. (1980) Measurement of sites of base loss, in: E. C. Friedberg and P. C. Hanawalt (Eds.), *DNA Repair: A Laboratory Manual of Research Procedures*, Vol 1A, Marcel

- Dekker, New York, pp. 213-216.
- Linsley, P. S. and L. Siminovitch (1982) Comparison of phenotypic expression with genotypic transformation by using cloned, selectable markers. *Mol. Cell. Biol.* 2, 593-597.
- Lloyd R. S., C. W. Haidle and D. L. Robberson (1978) Bleomycin-specific fragmentation of double-stranded DNA. *Biochemistry* 17, 1890-1896.
- Loyter, A., G. A. Scangos and F. H. Ruddle (1982) Mechanisms of DNA uptake by mammalian cells: Fate of exogenously added DNA monitored by the use of fluorescent dyes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 422-426.
- Lusky, M. and M. Botchan (1981) Inhibition of SV40 replication in simian cells by specific pBR322 sequences. *Nature* 293, 79-81.
- Madhani, H. D., V. A. Bohr and P. C. Hanawalt (1986) Differential DNA repair in transcriptionally active and inactive proto-oncogenes: *c-abl* and *c-mos*. *Cell* 45, 417-422.
- Maniatis, T., E. F. Fritsch and J. Sambrook (1982), in *Molecular cloning, a laboratory manual*, Cold Spring Harbor, New York.
- Marmur, J. and L. Grossman (1961) Ultraviolet light induced linking of deoxyribonucleic acid strands and its reversal by photoreactivating enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 47, 778-787.
- Mellon, I., G. Spivak and P. C. Hanawalt (1987) Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene. *Cell* 51, 241-249.
- Miller, J. (1972) in *Experiments in Bacterial Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, p. 352.
- Mitchell, D. L. (1988) The relative cytotoxicity of (6-4) photoproducts and cyclobutane dimers in mammalian cells. *Photochem. Photobiol.* 48, 51-57.
- Mizusawa, H., C-H. Lee and T. Kakefuda (1981) Alteration of plasmid DNA-mediated transformation and mutation induced by covalent binding of benzo[a]pyrene-7,8-

dihydrodiol-9,10-oxide in *Escherichia coli*. *Mutat. Res.* 82, 47-57.

- Moustacchi, E., D. Auerbeck, C. Diatlof-Zito and D. Papadopoulo (1989) Phenotypic and genetic heterogeneity in Fanconi anemia, fate of cross-links, and correction of the defect by DNA transfection, in: T. M. S. Schroeder-Kurth, A. D. Auerbach and G. Obe (Eds.), *Fanconi Anemia, Clinical, Cytogenetic and Experimental Aspects*, Springer-Verlag, Berlin, pp. 196-210.
- Mulligan, R. C. and P. Berg (1980) Expression of a bacterial gene in mammalian cells. *Science* 209, 1422-1427.
- Mulligan, R. C. and P. Berg (1981a) Selection for animal cells that express the *Escherichia coli* gene coding for xanthine-guanine phosphoribosyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 2072-2076.
- Mulligan, R. C. and P. Berg (1981b) Factors governing the expression of a bacterial gene in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 1, 449-459.
- Nagata, Y., H. Takagi, T. Morita and M. Oishi (1984) Stimulation of DNA-mediated transformation by UV irradiation of recipient (mouse FM3A) cells. *J. Cell. Physiol.* 121, 453-457.
- Nairn, R. S., R. M. Humphrey and G. M. Adair (1988a) Transformation of UV-hypersensitive Chinese hamster ovary cell mutants with UV-irradiated plasmids. *Int. J. Rad. Bio* 53, 249-260.
- Nairn, R. S., R. M. Humphrey and G. M. Adair (1988b) Transformation depending on intermolecular homologous recombination is stimulated by UV damage in transfected DNA. *Mutat. Res.* 208, 137-141.
- Parker, M. I., J. B. de Haan and W. Gevers (1986) DNA hypermethylation in sodium butyrate-treated WI38 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 261, 2786-2790.
- Parker, B. and G. R. Stark (1979) Regulation of Simian Virus 40 transcription: sensitive analysis of the RNA species present early in infections by virus or virus DNA. *J. Virol.* 31, 360-369.

- Postel, E. H. (1985) Enhancement of genetic transformation frequencies of mammalian cell cultures by damage to the cell DNA. *Mol. Gen. Genet.* 201, 136-139.
- Protic-Sabljić, M. and K. H. Kraemer (1985) One pyrimidine dimer inactivates expression of a transfected gene in xeroderma pigmentosum cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 6622-6626.
- Rahn, O. R. (1983) Sensitized photoinduction of pyrimidine dimers in DNA, in: E. C. Friedberg and P. C. Hanawalt (Eds.), *DNA Repair: A Laboratory Manual of Research Procedures*, Vol 2, Marcel Dekker, New York, pp. 75-85.
- Rahn, O. R., L. C. Landry and W. L. Carrier (1974) Formation of chain breaks and thymine dimers in DNA upon photosensitization at 313 nm with acetophenone, acetone or benzophenone. *Photochem. Photobiol.* 19, 75-78.
- Reynolds, R. J., K. H. Cook and E. C. Friedberg (1980) Measurement of thymine-containing pyrimidine dimers by one-dimensional thin-layer chromatography, in: E. C. Friedberg and P. C. Hanawalt (Eds.), *DNA Repair: A Laboratory Manual of Research Procedures*, Vol 1A, Marcel Dekker, New York, pp. 11-21.
- Sarasin, A. R. and P. C. Hanawalt (1980) Replication of ultraviolet-irradiated simian virus 40 in monkey kidney cells. *J. Mol. Biol.* 138, 299-319.
- Schmid, S. E., M. P. Duane and R. P. P. Fuchs (1982) Repair and mutagenesis of plasmid DNA modified by ultraviolet irradiation of N-acetoxy-N-2-acetylaminofluorene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 4133-4137.
- Seawell, P. C. and A. K. Ganesan (1981) Measurement of strand breaks in supercoiled DNA by gel electrophoresis, in: E. C. Friedberg and P. C. Hanawalt (Eds.), *DNA Repair: A Laboratory Manual of Research Procedures*, Vol 1B, Marcel Dekker, New York, pp. 425-430.
- Seemayer, N. H. and V. Defendi (1973) Analysis of minimal functions of simian virus 40. II. Enhancement of oncogenic transformation *in vitro* by UV irradiation. *J. Virol* 12, 1265-1271.

- Setlow, R. B. and W. L. Carrier (1966) Pyrimidine dimers in ultraviolet-irradiated DNA. *J. Mol. Biol.* 17, 237-254.
- Smith, C. A. and P. C. Hanawalt (1976) Repair replication in cultured normal and transformed human fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta* 447, 121-132.
- Smith, C. A. and P. C. Hanawalt (1978) Phage T4 endonuclease V stimulates DNA repair replication in isolated nuclei from ultraviolet-irradiated human cells, including xeroderma pigmentosum fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 2598-2602.
- Southern, P. J. and P. Berg (1982) Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. *J. Mol. Appl. Genet.* 1, 327-341.
- Spivak, G., A. K. Ganesan and P. C. Hanawalt (1984) Enhanced transformation of human cells by UV-irradiated pSV2 plasmids. *Mol. Cell. Biol.* 4, 1169-1171.
- Spivak, G., S. A. Leadon, J-M. Vos, A. K. Ganesan and P. C. Hanawalt (1987) Transformation of human cells with damaged plasmids, in: *Letters and Symposia 14th Int. Cancer Congr. Budapest*, vol. 4, pp. 107-118.
- Spivak, G., S. A. Leadon, J-M. Vos, S. Meade, P. C. Hanawalt and A. K. Ganesan (1988) Enhanced transforming activity of pSV2 plasmids in human cells depends upon the type of damage introduced into the plasmid. *Mutat. Res.* 193, 97-108.
- Teebor, G. W., K. Frenkel and M. S. Goldstein (1982) Characterization of thymine damage in oxidized and gamma-irradiated DNA, in: A. T. Natarajan, G. Obe and H. Altmann (Eds.), *DNA Repair, Chromosome Alterations and Chromatin Structure, Progress in Mutation Research, Vol 4*, Elsevier Medical, Amsterdam, pp. 301-311.
- Umlas, M. E., W. A. Franklin, G. L. Chan and W. A. Haseltine (1985) Ultraviolet irradiation of defined-sequence DNA under conditions of chemical photosensitization. *Photochem. Photobiol.* 42, 265-273.
- van Duin, M., A. Westerveld and J. H. J. Hoeijmakers (1985) UV stimulation of DNA-mediated transformation of human cells. *Mol. Cell. Biol.* 5, 734-741.

- Vos, J-M. (1988) Analysis of psoralen monoadducts and interstrand crosslinks in defined genomic sequences, in: E. C. Friedberg and P. C. Hanawalt (Eds.), *DNA Repair: A Laboratory Manual of Research Procedures*, vol. III, Marcel Dekker, New York, pp. 367-398.
- Vos, J-M. H. and P. C. Hanawalt (1989) Effect of DNA damage on stable transformation of mammalian cells with integrative and episomal plasmids. *Mutat. Res.* 220, 205-220.
- Wang, S. Y. (1976) Pyrimidine bimolecular photoproducts, in: S. Y. Wang (Ed.), *Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids*, Vol I, Academic Press, New York, pp. 295-356.
- Wigler, M., A. Pellicer, S. Silverstein, R. Axel, G. Urlaub y L. Chasin (1979) DNA-mediated transfer of the adenine phosphoribosyltransferase locus into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 1373-1376.
- Wobbe, C. R., Y. Murakami, F. Dean, L. Weissbach y J. Hurwitz (1987) *In vitro* replication of SV40 and polyoma virus DNA, in R. McMacken y T. J. Kelly (Eds.), *DNA Replication and Recombination*, UCLA Symposia on Molecular and Cell Biology, Alan R. Liss Inc., New York, pp. 303-313.
- Yasuda, S. and M. Sekiguchi (1970) T4 endonuclease involved in repair of DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 67, 1839-1845.
- Yoder, J. I., and A. T. Ganesan (1983) Procaryotic genomic DNA inhibits mammalian cell transformation. *Mol. Cell. Biol.* 3, 956-959.