

UCH-FC  
DOC-B  
5684  
c.1

ESTUDIO DE ALGUNAS REACCIONES DE  
PROCESAMIENTO DE tRNA EN OOCITOS DE  
XENOPUS LAEVIS

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias de la  
Universidad de Chile en cumplimiento parcial a los re-  
quisitos para optar al grado de Doctor en Ciencias con  
mención en Biología.

por:

ALDO SOLARI ILLESCAS

Marzo, 1980

Profesor patrocinante  
Dr. Jorge E. Allende



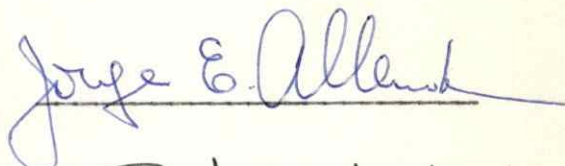
Facultad de Ciencias  
Universidad de Chile  
Santiago Norte

INFORME DE APROBACION  
TESIS DE DOCTORADO

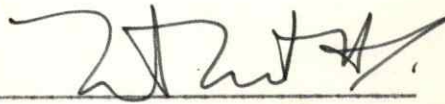
Se informa a la Comisión de Doctorado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el Candidato

Aldo Solari Illescas  
ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de tesis para el grado de Doctor en Ciencias con Mención en Biología, en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 15 de Marzo.

Dr. Jorge E. Allende  
Patrocinante de Tesis



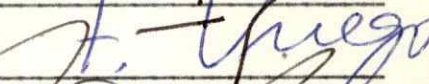
Comisión informante de Tesis  
Dr. Tito Ureta



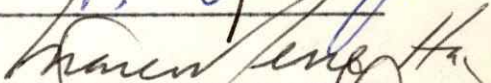
Dr. Jorge Babul



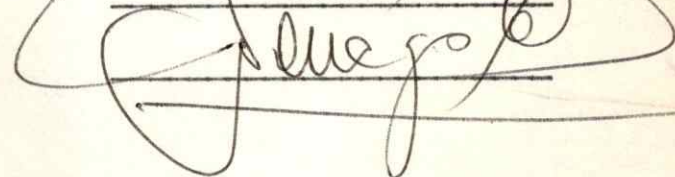
Dr. Fernando Orrego



Dr. Marco Perretta



Dr. Alejandro Venegas



Esta tesis fue realizada en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina Norte de la Universidad de Chile, bajo la dirección del Dr. Jorge E. Allende y contó además con el patrocinio del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina Norte, Universidad de Chile, que dirige el Dr. Lionel Gil, y del cual el autor de esta tesis es miembro académico.

Dedico esta tesis a  
Patricia, Paola y Mauricio



## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis agradecimientos a las siguientes personas, cuya contribución ha sido importante para el desarrollo de esta tesis:

Al Dr. Jorge Allende por su apoyo crítico y por entregarme una formación profesional en investigación científica.

A Catherine Connelly por su constante apoyo moral y el aporte valioso de ideas.

A Adelita Tarragó por su desinteresada y eficaz colaboración en la revisión de este escrito.

A todos los integrantes del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina Norte de la Universidad de Chile, quienes de uno u otro modo han contribuido en mayor o menor forma al desarrollo de esta tesis. Deseo también testimoniar mi agradecimiento a los que han sido Directores de este Departamento durante mi permanencia en el Programa de Doctorado, quienes me han otorgado facilidades para materializar esta tesis.

A José Mondaca, por el excelente trabajo realizado en la confección de las figuras.

A Myrtha Davidson por su esmero en la expedita transcripción del texto.

## RESUMEN

Durante el desarrollo de esta tesis se ha estudiado el procesamiento de tRNA en oocitos de Xenopus laevis. Esto representa una serie de reacciones enzimáticas que ocurren sobre los precursores de tRNA para transformar estos últimos en moléculas maduras de tRNA. Este proceso post-transcripcional se ha explorado a nivel de algunas actividades enzimáticas que participan en la maduración de los tRNA, tales como la tRNA nucleotidil transferasa (EC 2.7.7.25), que cataliza la incorporación de la secuencia CCA en el extremo 3'-OH del tRNA y las tRNA metil transferasas que catalizan la modificación de nucleósidos introduciendo grupos metilo en los precursores de tRNA.

Se ha estudiado además la distribución subcelular de las enzimas mencionadas en los compartimentos de núcleo y citoplasma, los cuales se separan entre sí por disección manual de oocitos aislados de Xenopus laevis. Se ha podido determinar que las tRNA metil transferasas se encuentran distribuidas tanto en el compartimento nuclear como en el citoplasmático y se ha encontrado que las tRNA metil transferasas existentes en cada compartimento serían enzimas distintas, como se establece por diversos criterios. En el núcleo de estas células se encuentra una tRNA metil transferasa de peso molecular de 190.000 y que es estimulada en su actividad enzimática por espermia cuando se usa tRNA total de Escherichia coli como



sustrato. En cambio en el citoplasma de estos oocitos se encuentra una tRNA metil transferasa de peso molecular de 125.000 y que se inhibe en presencia de espermina cuando se analiza en las mismas condiciones que la enzima nuclear. Estos resultados permiten postular que la distribución de las dos tRNA metil transferasas podría resultar de una metilación secuencial del precursor de los tRNA que se deben desplazar del núcleo al citoplasma.

Estudios hechos sobre la distribución subcelular de la tRNA nucleotidil transferasa, indican que la actividad enzimática se encuentra distribuida tanto en el compartimento nuclear como en el citoplasmático. Las actividades enzimáticas de ambos compartimentos son idénticas en cromatografía en columnas de dietilamino etil celulosa y en su dependencia de pH.

En esta tesis también se ha estudiado la actividad de la tRNA nucleotidil transferasa citoplasmática "in vivo" por microinyección en oocitos de tRNA<sup>phe</sup> tratado químicamente para remover parcialmente la secuencia CCA.

Los resultados obtenidos indican que este tRNA<sup>phe</sup> tratado conserva su funcionalidad pues es reparado por la tRNA nucleotidil transferasa endógena y por ende puede ser aminoacilado. El estudio de la tRNA nucleotidil transferasa medida por este ensayo "in vivo" indica que la enzima presenta las mismas características de especificidad que las descritas "in vitro". Estos resultados

representan la evidencia más clara tendiente a establecer la capacidad del citoplasma de una célula viva de reparar el terminal 3' de un tRNA.

## ABSTRACT

This thesis reports the study of the processing of transfer ribonucleic acid (tRNA) using oocytes from the amphibian Xenopus laevis. This post transcriptional process has been analyzed in relation to certain enzyme activities known to be involved in the maturation of tRNA, for example, the tRNA nucleotidyl transferase (EC 2.7.7.25), which catalyzes the incorporation of the so called "CCA" sequence (cytidyl-cytidyl-adenosine) at the 3'-OH terminal of tRNA and the tRNA methyl transferase that catalyzes the incorporation of methyl groups into the tRNA precursors.

In addition the intracellular distribution of these enzymes has been studied, in the nucleus and cytoplasm of these oocytes, using the technique of manual dissection of the nucleus from the isolated oocytes of Xenopus laevis. It was observed that the tRNA methyl transferase activity is distributed in the nuclear as well as cytoplasmic compartment and that the tRNA methyl transferase activities in these different cellular compartments correspond to different enzymes, as established by several criteria. In the nucleus there is a tRNA methyl transferase of molecular weight 190,000 whose activity is stimulated by spermine, when assayed using unfractionated tRNA from Escherichia coli as substrate. In the oocyte cytoplasm, there is a tRNA methyl transferase of molecular weight 125,000 which is inhibited by spermine when assayed using the same conditions



described for the nuclear activity. These results suggest that the distribution of the two tRNA methyl transferases could result in a sequential methylation of the tRNA precursor as it is displaced from nucleus to cytoplasm.

Studies carried out on the intracellular distribution of the tRNA nucleotidyl transferase indicated that this activity is present in the nuclear and cytoplasmic compartment. The activities in both compartments are identical in column chromatography on diethylamino ethyl-cellulose and in their pH dependence.

This thesis also reports on the study of tRNA nucleotidyl transferase activity under "in vivo" conditions, that is, by microinjection of chemically treated tRNA specific for phenylalanine (tRNA<sup>phe</sup>) in which the terminal "CCA" sequence was partially removed by prior chemical treatment.

The results show that the treated tRNA<sup>phe</sup> remained functional (capable of aminoacylation) since the molecule was repaired by the endogenous tRNA nucleotidyl transferase and subsequently aminoacylated. The study of the tRNA nucleotidyl transferase measured in this "in vivo" assay demonstrates that the endogenous enzyme has characteristics similar to those observed in the standard "in vitro" assay. These results represent the clearest evidence in favour of the capacity of the cytoplasm of the living cell to repair the 3' terminus of tRNA.

## INDICE DE MATERIAS

	Pág.
RESUMEN .....	II
ABSTRACT .....	V
ABREVIATURAS .....	XII
LISTA DE FIGURAS .....	XIV
LISTA DE TABLAS Y ESQUEMAS .....	XVIII
CAPITULO I INTRODUCCION	
1. Introducción general .....	1
2. Aspectos generales sobre el estudio de procesamiento de tRNA en procariotes .....	2
3. Generalidades sobre el procesamiento de tRNA en eucariotes .....	3
4. Reacciones enzimáticas que participan en el procesamiento de tRNA .....	4
4.1. Endonucleasas .....	4
4.2. Exonucleasas .....	7
4.3. Enzimas modificadoras de nucleósidos .....	9
4.3.1. Nucleósidos modificados encontrados en el asa del anticodón .....	9
4.3.2. Modificaciones de nucleósidos encontrados en otras regiones estructurales del tRNA .....	13
4.3.2.1. Dihidrouridina .....	13
4.3.2.2. Tiouridina .....	13
4.3.2.3. Pseudouridina .....	14



	Pág.
4.3.3. Modificación de bases y azúcares por grupos metilo .....	16
4.3.3.1. La especificidad de las tRNA metil transferasas .....	16
4.3.3.2. Sustratos donadores de grupos metilo..	19
4.3.3.3. Metilación de nucleósidos y cáncer ...	20
4.3.3.4. Significado fisiológico de los nucleósidos metilados .....	20
4.4. Incorporación de la secuencia CCA en el extremo 3' terminal de los tRNA .....	22
5. Evidencias que permiten postular una secuencia ordenada de eventos o "via metabólica" en el procesamiento de tRNA .....	25
5.1. Estudios de composición de nucleósidos modificados en precursores de tRNA .....	25
5.2. Estudios de pulso y caza en metilación de tRNA .....	26
5.3. Resultados de procesamiento de tRNA en sistemas heterólogos .....	27
5.4. Orden de etapas en la génesis de la secuencia CCA en <u>E. coli</u> .....	29
6. Estudio de algunas reacciones de procesamiento de tRNA en oocitos de <u>X. laevis</u> realizadas en la presente tesis .....	31
 CAPITULO II MATERIALES Y METODOS	
1. METODOS .....	33
1.1. Purificación de tRNA metil transferasas...	33

	pág.
1.2. Ensayo de medición de actividad enzimática de tRNA metil transferasas .....	34
1.3. Obtención de núcleos y oocitos anucleados.	34
1.4. Medición de actividad enzimática para tRNA metil transferasas y tRNA nucleotidil transferasa desde sobrenadantes de núcleos, oocitos anucleados y oocitos enteros .....	35
1.5. Purificación de tRNA nucleotidil transferasa .....	35
1.6. Ensayo "in vivo" de medición de actividad enzimática para tRNA nucleotidil transferasa...	36
1.7. Preparación de tRNA <sup>phe</sup> modificados en su extremo 3' .....	37
1.8. Microinyección de tRNA.....	38
1.9. Cuantificación "in vivo" de la tRNA nucleotidil transferasa .....	39
1.10. Purificación de tRNA total de hígado y ovario de <u>X. laevis</u> .....	40
1.11. Determinación de pesos moleculares de tRNA nucleotidil transferasa y tRNA metil transferasas .....	41
2. FUENTE DE LOS MATERIALES .....	42

### CAPITULO III RESULTADOS

1. CARACTERIZACION DE ALGUNAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS QUE PARTICIPAN EN EL PROCESAMIENTO DE tRNA EN OOCITOS DE <u>X. LAEVIS</u> .....	45
---	----



	Pág.
1.1. tRNA nucleotidil transferasa .....	45
1.1.1. Purificación parcial de la tRNA nucleotidil transferasa .....	45
1.1.2. Caracterización de la tRNA nucleotidil transferasa parcialmente purificada desde ovario .....	48
1.1.3. Determinación de peso molecular de la tRNA nucleotidil transferasa .....	51
1.1.4. Determinación de constantes cinéticas de la reacción de incorporación de CMP y AMP a tRNA catalizada por la tRNA nucleotidil transferasa .....	54
1.2. tRNA metil transferasas .....	56
1.2.1. Identificación de un tRNA sustrato para las tRNA metil transferasas de oocitos .....	56
1.2.2. Análisis de tRNA metilado por las tRNA metil transferasas de oocitos .....	58
1.2.3. Purificación parcial de las tRNA metil transferasas de ovario de <u>X. laevis</u> .....	60
1.2.4. Caracterización de las fracciones I y II de tRNA metil transferasas de ovario .....	60
1.2.5. Caracterización cinética de las tRNA metil transferasas I y II de ovario .....	63
1.2.6. Especificidad sustrato de las tRNA metil transferasas I y II de ovario .....	73
1.2.7. Determinación de peso molecular de las tRNA metil transferasas I y II de ovario.....	73



2. DISTRIBUCION SUBCELULAR DE LA tRNA NUCLEOTIDIL TRANSFERASA Y DE LAS tRNA METIL TRANSFERASAS EN OOCITOS DE <u>X. LAEVIS</u> .....	77
2.1. Distribución subcelular de la tRNA nucleotidil transferasa .....	81
2.2. Caracterización de la tRNA nucleotidil transferasa proveniente de núcleos y citoplasma	84
2.3. Distribución subcelular de las tRNA metil transferasas de oocito .....	88
2.4. Caracterización de las tRNA metil transferasas provenientes de núcleos y citoplasma ....	88
3. ESTUDIO "IN VIVO" DE LA tRNA NUCLEOTIDIL TRANSFERASA .....	97
3.1. Cinética de reparación de la secuencia CCA "in vivo" .....	97
3.2. Especificidad sustrato de la tRNA nucleotidil transferasa "in vivo" .....	99
 CAPITULO IV	
DISCUSION .....	103
 BIBLIOGRAFIA .....	113

## ABREVIATURAS

Ci	Curie
DEAE	Dietil amino etil
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Acido etilén diamino tetracético
g	Campo gravitacional (n° de veces la gravedad en el centro del tubo).
Poli U	Acido poliuridílico
pp G PP	Guanosin-5'-difosfato, 3' o 2'-difosfato
ppp G pp	Guanosin-5'-trifosfato, 3' o 2'-difosfato
SAM	S-Adenosil-L-metionina
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
trNA <sup>phe</sup>	trNA específico para fenilalanina
trNA <sup>tyr</sup> sup3	trNA supresor sin sentido que carga tirosina
V <sub>o</sub>	Volumen de vacío
K <sub>av</sub>	Velución-V <sub>vacío</sub>
1 m A	1 metil Adenosina
2 m A	2 metil Adenosina
N <sup>6</sup> m A	N <sup>6</sup> metil Adenosina
N <sup>6,6</sup> dim A	N <sup>6,6</sup> dimetil Adenosina

i<sup>6</sup>A  
m<sup>2</sup><sub>B</sub> i<sup>6</sup>A

t<sup>6</sup>A

3 m C

5 m C

2'-O-m C

D

7 m G

N<sup>2</sup> m G

N<sup>2,2</sup> dim G

2'-O-m G

Q

z T

•<sup>4</sup>U

2'-O-m U

ψ

Y

N<sup>6</sup>-isopentenil Adenosina

2-metil tio-N<sup>6</sup>-isopentenil

Adenosina

N<sup>6</sup>-(N-treonil carbonil) Adenosina

3 metil Citidina

5 metil Citidina

2'-O-metil Citidina

dihidro Uridina

7 metil Guanosina

N<sup>2</sup> metil Guanosina

N<sup>2,2</sup> dimetil Guanosina

2'-O-metil Guanosina

7-(4,5-cis-dihidroxi-1-ciclopenten-

3-il-aminometil) -7-desaza Guanosina

ribo Timidina

Tio Uridina

2'-O-metil Uridina

pseudo Uridina

base α-(carboxiamino)-4,9-dihidro-

4,6-dimetil-9-oxo-14-imidazolpurina

-7-butirato dimetil ester

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Purificación parcial de la tRNA nucleotidil transferasa de ovario de <u>X. laevis</u> por cromatografía en DEAE-celulosa.....	46
Figura 2. Determinación de peso molecular de la tRNA nucleotidil transferasa de ovario de <u>X. laevis</u> .....	52
Figura 3. Efecto de la concentración de ATP y CTP en la velocidad de reacción de la tRNA nucleotidil transferasa de ovario de <u>X. laevis</u> .....	55
Figura 4. Fraccionamiento y purificación parcial de las tRNA metil transferasas de ovario de <u>X. laevis</u> por cromatografía en DEAE-celulosa.....	61
Figura 5. Actividad de la tRNA metil transferasa I en presencia de los iones $Mg^{+2}$ , espermina y KCl.....	64
Figura 6. Actividad de la tRNA metil transferasa II en presencia de espermina y KCl.....	66



Figura 7. Efecto de la concentración de tRNA sobre la velocidad de las tRNA metil transferasas I y II de ovario de <u>X. laevis</u> .....	69
Figura 8. Estudio de las constantes cinéticas de las tRNA metil transferasas I y II para el donador de metilos SAM...	71
Figura 9. Capacidad aceptora de grupos metilos de tRNA purificados de <u>E. coli</u> catalizada por las tRNA metil transferasas I y II de ovario de <u>X. laevis</u> ...	74
Figura 10. Capacidad aceptora de grupos metilo del tRNA total de <u>E. coli</u> catalizada por la tRNA metil transferasa I de ovario de <u>X. laevis</u> .....	76
Figura 11. Determinación de peso molecular de las tRNA metil transferasas I y II de ovario de <u>X. laevis</u> .....	78
Figura 12. Determinación de peso molecular de la tRNA metil transferasa I de ovario de <u>X. laevis</u> .....	80
Figura 13. Distribución subcelular de tRNA nucleotidil transferasa en oocitos de <u>X. laevis</u> .....	82



	Pág.
Figura 14. pH óptimo de la actividad tRNA nucleotidil transferasa existente en núcleo y citoplasma de oocitos de <u>X. laevis</u> .....	85
Figura 15. Comportamiento cromatográfico en DEAE-celulosa de la tRNA nucleotidil transferasa de núcleos, oocitos anucleados y oocitos enteros de <u>X.laevis</u> .....	86
Figura 16. Distribución subcelular de las tRNA metil transferasas en oocitos de <u>X. laevis</u> .....	89
Figura 17. Efecto de Mg <sup>+2</sup> y espermina en la actividad de tRNA metil transferasa existente en núcleos de oocitos de <u>X. laevis</u> .....	92
Figura 18. Efecto de Mg <sup>+2</sup> y espermina en la actividad de tRNA metil transferasa existente en oocitos anucleados de <u>X. laevis</u> .....	93
Figura 19. Fraccionamiento en DEAE-celulosa de las tRNA metil transferasas de núcleo oocito anucleado y oocito entero de <u>X. laevis</u> .....	95

Figura 20. Cinética de aminoacilación "in vivo" de tRNA<sup>phe</sup> intacto e hidrolizado en su extremo 3'..... 98

LISTA DE TABLAS Y ESQUEMAS

	Pág.
Esquema I	Sitios de metilación..... 17
Tabla I	Cantidad relativa de nucleósidos metilados existentes en tRNA de diferente origen..... 15
Tabla II	Requerimientos de la tRNA nucleotidil transferasa de ovario de <u>X. laevis</u> ..... 49
Tabla III	Capacidad aceptora de grupos metilo en tRNA de diverso origen..... 57
Tabla IV	Estudio de la marca incorporada a tRNA por incubación de enzima de <u>X. laevis</u> y [ <sup>3</sup> H] metil SAM..... 59
Tabla V	Aminoacilación de tRNA <sup>phe</sup> con diferentes extremos 3' inyectados a oocitos de <u>X. laevis</u> ..... 100

## CAPITULO I

### INTRODUCCION

#### 1. INTRODUCCION GENERAL

El procesamiento de tRNA consiste en una serie de reacciones post-transcripcionales que convierten una molécula precursora de RNA de transferencia en el producto maduro que desempeña importantes funciones en el metabolismo celular.

En dicho procesamiento participan múltiples reacciones enzimáticas que se presume actúan en una secuencia ordenada constituyendo una verdadera vía metabólica.

Algunas de las reacciones encontradas en este procesamiento son de tipo hidrolíticas, catalizadas por nucleasas, otras involucran modificaciones covalentes de nucleósidos y existe un último tipo de reacciones que incorporan nucleótidos a precursores de tRNA.

Debido a la corta vida media de las moléculas precursoras de tRNA ha sido difícil aislarlos y por eso se ha dificultado el estudio de su procesamiento. Por estas razones la disponibilidad de mutantes para actividades enzimáticas de procesamiento tanto de bacterias como de levaduras ha sido muy importante para avanzar en el conocimiento de este proceso.



## 2. ASPECTOS GENERALES SOBRE EL ESTUDIO DE PROCESAMIENTO DE tRNA EN PROCARIOTES

Existe una gran cantidad de información aportada por el hallazgo de múltiples mutantes de procesamiento de tRNA en bacterias.

Es con este enfoque genético que se ha podido secuenciar algunos precursores de tRNA que logran acumularse en los mutantes. Esta información ha sido determinante para aclarar las múltiples etapas del esquema de procesamiento, así como para dilucidar la especificidad de las enzimas involucradas.

Los sistemas más estudiados son: a) el de tRNA<sup>tyr</sup> sup3 cuyo procesamiento "in vitro" como "in vivo" se ha estudiado haciendo uso del gen para el tRNA<sup>tyr</sup> inserto en el fago transductor  $\phi$  80 y b) los tRNA diméricos codificados por el DNA de fagos T<sub>4</sub> y T<sub>2</sub>.

Aunque aún no se ha podido aislar el transcrito primario para tRNA<sup>tyr</sup> sup3, existen datos "in vitro" que este transcrito primario sería una molécula que contiene 41 nucleótidos extra en el extremo 5' y posee 225 nucleótidos más allá de la secuencia CCA del extremo 3' ( 1 ). Por el contrario, la molécula precursora del mismo tRNA aislado "in vivo" desde una mutante de nucleasa presenta la misma secuencia extra en el extremo 5' sin embargo, contiene sólo dos nucleótidos más allá de la secuencia CCA ( 2 ).



Otro sistema en que se ha estudiado el procesamiento de tRNA es el del fago T<sub>4</sub>. Este bacteriófago contiene 8 genes para tRNA agrupados en su genoma. Un grupo de 7 genes se transcriben conjuntamente para entregar un precursor multimérico el cual es hidrolizado a precursores diméricos como son: tRNA<sup>glu-leu</sup>, tRNA<sup>pro-ser</sup> y tRNA<sup>thr-ile</sup> mediante la acción de nucleasas (3). Estos precursores a su vez continúan el proceso de maduración para entregar los productos procesados (4).

### 3. GENERALIDADES SOBRE EL PROCESAMIENTO DE tRNA EN EUCARIOTES

La información que se tiene sobre el procesamiento de tRNA en eucariotes es menor que en el caso de bacterias, ya que ha sido difícil enfocar el estudio con herramientas genéticas. Sin embargo, se postula que el procesamiento de tRNA en estos organismos es más complejo que en procariotes, basado en el hecho que los tRNA maduros de eucariotes contienen un mayor número de nucleósidos modificados, lo cual permite suponer más etapas de procesamiento.

Es interesante mencionar que a diferencia de lo conocido en bacterias se ha encontrado recientemente que algunos genes de tRNA de levadura y Drosophila contienen una secuencia nucleotídica de 12 a 30 nucleótidos que se intercala en el medio de las zonas que codifican para el tRNA maduro (5, 6). Al estudiar los RNA provenientes de dichos genes se ha encontrado que esa secuencia interca-

lada o intrón, se transcribe de modo que el precursor de tRNA debe sufrir un procesamiento que involucra la remoción de un oligonucleótido y la subsiguiente unión de las puntas del tRNA (7).

#### 4. REACCIONES ENZIMATICAS QUE PARTICIPAN EN EL PROCESAMIENTO DE tRNA

##### 4.1. Endonucleasas

Se han descrito una serie de enzimas con actividad endonucleásica, pero sólo algunas de ellas han demostrado tener participación en el procesamiento de precursores de tRNA.

El grupo de Altman ha estudiado una endonucleasa llamada RNA<sub>sa</sub> P que posee especificidad para hidrolizar precursores de tRNA con un segmento extra en el extremo 5' (51) De este modo la enzima hidroliza los precursores para generar la punta 5' de todos los tRNA maduros.

Se han aislado mutantes termosensibles para la RNA<sub>sa</sub> P que a las temperaturas no permisivas acumulan precursores de tRNA, los cuales se caracterizan por tener alto peso molecular en geles de acrilamida(2). Es con estos mutantes que se ha avanzado considerablemente en el conocimiento del procesamiento de tRNA.

La RNA<sub>sa</sub> P de bacterias se ha podido purificar a homogeneidad y presenta características de ser un complejo ribonucleoproteico compuesto por un 80% de RNA



y un 20% de proteínas. El componente de RNA es indispensable para la actividad y tiene 300 nucleótidos (8).

En eucariotes se ha encontrado una actividad semejante y se ha observado que fracciones purificadas de ella logran reconocer precursores de tRNA de bacterias (9). Si bien se tiene a la RNA<sub>sa</sub> P pura y se sabe su función, no ha sido posible conocer la especificidad de la enzima. Por mucho tiempo se ha trabajado en el precursor de tRNA<sup>tyr</sup> sup3 en la búsqueda de mutantes puntuales del gen de este tRNA, para precisar que cambios en la secuencia del sustrato alteran el reconocimiento por parte de la enzima (10).

Se puede concluir que si bien existe una buena cantidad de información genética y bioquímica, no es posible al momento establecer cuál sería la especificidad de reconocimiento de sustratos por parte de la endonucleasa P. Solamente se puede descartar que la enzima reconozca una secuencia determinada de nucleótidos. Sin embargo, si resulta claro que la enzima debe reconocer más bien estructuras secundarias y/o terciarias en sus sustratos y no secuencias nucleotídicas.

Se han descrito otras endonucleasas que podrían participar en el procesamiento de tRNA, pero éstas han sido menos estudiadas que la RNA<sub>sa</sub> P y no se posee aún evidencia genética que demuestre su participación en la biosíntesis de tRNA.

Utilizando como sustrato un RNA transcrito obtenido "in vitro" con genes de tRNA<sup>tyr</sup> sup3 que contiene só-



lo 16 nucleótidos extra en el extremo 3' de los 225 que posee el transcrito primario, el grupo de Sekiya ha caracterizado una endonucleasa en E. coli llamada RNA<sub>sa</sub> P<sub>2</sub>, la cual es capaz de generar un precursor de tRNA<sup>tyr</sup> con sólo dos nucleótidos extra en el extremo 3' (78). Aparentemente la enzima reconocería una estructura secundaria del sustrato que se formaría en el extremo 5' de este precursor de tRNA formada por 5 pares de bases complementarias. Se cree hoy en día que esta RNA<sub>sa</sub> P<sub>2</sub> juega un rol en el procesamiento de tRNA en virtud de la evidencia encontrada "in vivo". Es así como en mutantes de RNA<sub>sa</sub> P, que se detecta una molécula precursora de tRNA con sólo dos nucleótidos extras más allá de la secuencia CCA tal como sucede con la RNA<sub>sa</sub> P<sub>2</sub> (2).

Otro grupo de investigadores han encontrado actividades endonucleásicas con características similares a la RNA<sub>sa</sub> P<sub>2</sub>. Sin embargo, se diferencian de la RNA<sub>sa</sub> P por poseer especificidad por precursores de tRNA mayores que los diméricos tales como transcritos primarios de fagos T<sub>4</sub>. Algunas de estas enzimas son la llamada RNA<sub>sa</sub> O (11) y RNA<sub>sa</sub> III (12).

Ultimamente se ha descrito en eucariotes el aislamiento de precursores con caracteres monoméricos desde mutantes de transporte de RNA en levaduras (13). Estos precursores además presentan secuencias intercaladas dentro del asa del anticodón que ya han sido mencionadas en la sección 3 de esta Introducción.

En cepas silvestres de levaduras y en oocitos de X. laevis se ha encontrado un sistema enzimático capaz de hidrolizar las puntas de la secuencia adicional y ligarlas posteriormente con la pérdida del oligonucleótido intercalado. Este oligonucleótido de los precursores de  $\text{trNA}^{\text{phe tyr}}$  es de 18 y 14 nucleótidos respectivamente y sólo se sabe que el sistema enzimático parece estar en el núcleo de la célula (7, 14)

Resultados muy preliminares para explicar el mecanismo de corte y unión en estos precursores de  $\text{trNA}$ , indican que se requiere de  $\text{Mg}^{+2}$ , ATP y cationes monovalentes. Parecería que las actividades endonucleásica y ligasa aparentemente operarían independientemente. Existe la evidencia que en ausencia de ATP o en presencia de  $\text{trNA}$  maduro, la secuencia intrónica es escindida, aunque las puntas no son selladas por la actividad ligasa del extracto (7).

#### 4.2. Exonucleasas

Existe un gran número de enzimas descritas con características de exonucleasas de especificidad 3', es decir, que catalizan la hidrólisis de RNA desde el extremo 3' hacia el 5'.

A pesar de que se han estudiado muchas de estas actividades enzimáticas, no se ha demostrado categóricamente que todas ellas participen en la biosíntesis de  $\text{trNA}$ . Sólo en el caso de la exonucleasa BN se ha podido



precisar que participa en el procesamiento de precursores de tRNA que no traen la secuencia CCA en el extremo 3'. Esto se ha podido afirmar por el aislamiento de una mutante que carece de esta actividad (15). El grupo de Seidman ha demostrado que esta exonucleasa procesa precursores de tRNA del fago T<sub>4</sub>, como es el caso del dímero pro-ser; sin embargo, no utiliza como sustratos a precursores que contienen la secuencia CCA en el extremo 3' del transcrito primario (16). El grupo de Deutscher (17) ha purificado a homogeneidad otra exonucleasa de especificidad 3' capaz de hidrolizar precursores de tRNA que contienen nucleótidos extras más allá de la secuencia CCA. Esta enzima llamada RNA<sub>sa</sub> D presenta también la capacidad de procesar al precursor de tRNA<sup>tyr</sup> sup3 aislado de mutantes de la RNA<sub>sa</sub> P. Se ha podido precisar que la enzima remueve los dos nucleótidos extras que posee el precursor en el extremo 3' y que su capacidad catalítica aumenta si el precursor de tRNA<sup>tyr</sup> sup3 se procesa previamente por la RNA<sub>sa</sub> P (17).

Se puede concluir que aparentemente no existe una exonucleasa que dé cuenta del procesamiento de todos los precursores de tRNA en el extremo 3', sino que existirían al menos dos enzimas distintas. Por un lado la RNA<sub>sa</sub> D parece reconocer sustratos que traen una secuencia adicional de nucleótidos más allá de la secuencia CCA y por otro, la RNA<sub>sa</sub> BN es capaz de procesar precursores que no traen dicha secuencia, sino que una cualquiera en su reemplazo.



#### 4.3. Enzimas modificadoras de nucleósidos

Se han descrito más de 50 nucleósidos modificados en los tRNA de procariotes y eucariotes. Estos nucleósidos se encuentran en diversas posiciones de la secuencia nucleotídica del tRNA y generalmente difieren en las diversas especies. En eucariotes existe un mayor número de estas bases modificadas o llamadas también bases raras o menores. Algunas de las bases y/o azúcares modificadas se encuentran en todos los sistemas biológicos, por lo que se sospecha que determinan alguna funcionalidad para el tRNA.

##### 4.3.1. Nucleósidos modificados encontrados en el asa del anticodón.

El asa del anticodón de muchos tRNA contiene bases modificadas de estructuras muy complejas. Estas bases son: a)  $N^6$ -isopentenil Adenosina; b) 2-metil tio- $N^6$ -isopentenil Adenosina; c)  $N^6$ -(N-treonil carbonil Adenosina; d) base Y y e) base Q.

Todas las bases modificadas mencionadas, excepto la base Q, se encuentran formando parte de la cuarta posición en el anticodón y la base Q se encuentra en posición opuesta a las señaladas, pues se la encuentra en la primera posición del anticodón.

Las bases  $i^6A$  y  $m^2s^6A$  parecen afectar la capacidad del tRNA aminoacilado para unirse a ribosomas, aunque la ausencia de la modificación en esta posición no

altera la capacidad del tRNA para ser aminoacilado (18). Ultimamente se ha encontrado una mutante en E. coli que no presenta la base m<sup>2</sup> s i<sup>6</sup> A en el anticodón de varios tRNA. Esta mutante si bien es viable, exhibe un nivel elevado de la enzima que intervienen en la biosíntesis del triptofano y que son codificadas por el operón triptofano. La mutante se ha denominado trp X y la explicación que se postula para la constitutividad de las enzimas de estas cepas, radicaría en que el tRNA<sup>trp</sup> no sería capaz de unirse por el anticodón a la región "líder" del atenuador en el operón triptofano. Esta anomalía impediría que la RNA polimerasa se detuviera en la región del atenuador y por ello se transcriben sin control las enzimas del operón triptofano (19).

Otra de las bases modificadas encontradas con frecuencia en el asa del anticodón de varios tRNA es la base t<sup>6</sup> A. Sólo se ha podido precisar que la enzima modificadora reconocería el nucleósido vecino al lugar de la modificación y que el proceso involucra varias etapas (20). Se ha encontrado que se necesita una mutación en punto en la secuencia del anticodón en tRNA<sup>gly</sup><sub>2</sub> de UCC a UCU para que la enzima reconozca a la cuarta base del anticodón y la modifique (21).

También se ha encontrado en esta región del anticodón en los tRNA<sup>phe</sup> de todos los organismos estudiados, la presencia de una base rara llamada Y. Estudios realizados con el propósito de determinar la función de esta ba-



se, indican que la remoción de ella por medio de un tratamiento ácido suave determina que el tRNA acilado no tenga un correcto reconocimiento con el codón respectivo, aunque no se altera la capacidad de aminoacilación ni de reconocer al factor de elongación 1 (22).

Existe un cuarto tipo de base modificada en el asa del anticodón y es la llamada base Q. A diferencia de las bases antes mencionadas, ésta se encuentra ocupando la primera posición del anticodón y por ende enfrenta a la tercera base del codón.

Esta base Q deriva de una Guanina y últimamente se ha encontrado que existe una actividad enzimática capaz de intercambiar la guanina de la primera posición del anticodón; sin embargo, esta enzima no es capaz de intercambiar la guanina cuando se encuentra modificada como base Q. Este ensayo ha permitido detectar en tRNA de tejidos cancerosos, una gran capacidad de incorporar guaninas en esa posición, lo cual sugiere que en este tipo de células a diferencia de las normales la modificación de la guanina a base Q no se realiza o sólo se verifica parcialmente (23).

El grupo de Nishimura ha reportado que una mutante termosensible para la modificación de esta base Q, determina que los tRNA que la contienen en el anticodón presentan en su lugar un precursor de la base Q, lo cual sugiere que la modificación ocurre en más de una etapa. Pero lo más interesante es que en estas mutantes también



se inhibe la replicación del DNA bacteriano a las temperaturas restrictivas (24). Estos resultados muy preliminares indican que el metabolismo de la base Q está relacionado de algún modo con la síntesis de DNA, lo cual representa un ejemplo de una nueva función para el tRNA.

Podemos concluir que el posible rol de estas bases modificadas en el anticodón y especialmente las existentes en la cuarta base del anticodón, sería el de impedir que se cometan errores de lectura del mensaje por parte de los tRNA. La explicación para esto, sería que la base modificada, por sus características estéricas impediría una interacción de puente de hidrógeno con alguna base complementaria en el codón. De este modo se tendría una verdadera señal para que la tercera base del anticodón lea la primera base del codón y se asegure así una lectura fiel del mensaje.

Otra serie de evidencias hace pensar que la funcionalidad de estas bases modificadas sería la de permitir una correcta interacción del anticodón con secuencias complementarias del DNA que involucran operones de la síntesis de aminoácidos. De este modo se puede explicar algunas funciones nuevas del tRNA en la regulación de la expresión génica y replicación del material genético.

#### 4.3.2. Modificaciones de nucleósidos encontrados en otras regiones estructurales del tRNA.

##### 4.3.2.1. Dihidrouridina.

En casi todos los tRNA existe una base modificada llamada dihidrouridina o D, la cual se encuentra siempre en la llamada asa dihidrouridina de los tRNA.

La presencia de esta base modificada todavía no tiene una explicación funcional y se tiene muy poca información sobre la(s) enzima(s) responsables de la modificación de los residuos de uridina.

##### 4.3.2.2. Tiouridina.

En la 8<sup>a</sup> posición a partir del extremo 5' de algunos tRNA de procariotes se encuentra una base derivada de uridina, en una reacción en que participa el aminoácido cisteína y que origina tiouridina. Esta base modificada se encuentra muy cercana en el espacio a la 13<sup>a</sup> de la secuencia. Esta cercanía se ha comprobado pues los tRNA que contienen esta base modificada forman una unión covalente entre las bases nitrogenadas 8<sup>a</sup> y 13<sup>a</sup> al ser irradiados con luz ultravioleta (25). La formación del enlace covalente por esta fotorreacción inactiva al tRNA en su capacidad de aminoacilarse.

Se ha aislado una mutante que no contiene esta base menor en los tRNA pertinentes y se ha podido corroborar los resultados "in vitro" pues cuando estos mutantes se irradian con luz ultravioleta son viables. Contrariamente, cepas silvestres que se irradian con luz ultravioleta



leta, detienen su crecimiento, como se podría esperar, ya que pierden la capacidad aceptora de aminoácidos (26).

#### 4.3.2.3. Pseudouridina.

La pseudouridina se encuentra en todos los tRNA pero se ha podido identificar al menos tres tipos de pseudouridinas, por su posición en la estructura del tRNA y por las enzimas que las generan. Un tipo de ellas se encuentra en la llamada asa T $\psi$ C que poseen todos los tRNA a excepción de los tRNA<sub>i</sub><sup>met</sup> en eucariotes. Un segundo tipo existe cerca del lado 3' del asa del anticodón y un tercer tipo se encuentra distribuido ubicuamente en los tRNA de eucariotes (27).

Ames y Lewis en S. typhimurium han aislado una mutante llamada his T, que determina la incapacidad del tRNA<sup>his</sup> para reprimir el operón histidina en un medio de cultivo rico en histidina. Estos resultados no se interpretan como una pérdida del tRNA en su capacidad de aminoacilarse, pues el tRNA<sup>his</sup> de estas cepas no pierde ninguna funcionalidad en la maquinaria de biosíntesis proteica (28). Se ha encontrado que estos mutantes no generan la pseudouridina cercana al anticodón, la cual le confiere al tRNA<sup>his</sup> la capacidad para regular la expresión del operón his. Las mutantes de esta cepa sin embargo, contienen la base pseudouridina en el asa T $\psi$ C lo que indicaría que esta última sería sintetizada por una enzima diferente.



TABLA I

Cantidad relativa de nucleósidos metilados existentes  
en tRNA de diferente origen.

Nucleósido	% del total			
	He La	Levadura	E. coli	Micoplasma
1 m G ) 7 m G )	21,2	22,9	43,6	61,0
1 m A	18,9	12,5	---	39,0
N <sup>2</sup> m G	10,9	16,9	---	---
N <sup>2,2</sup> dim G	16,5	24,9	---	---
5 m C	15,5	7,8	---	---
5 m U (r T)	10,0	14,1	36,5	---
2 m A	---	---	19,8	---
3 m C	2,3	---	---	---
3 m U	1,4	---	---	---
2'-O-m ribosas	4,5	+	+	---

+ significa detectable en cantidades trazas.

#### 4.3.3. Modificación de bases y azúcares por grupos metilo.

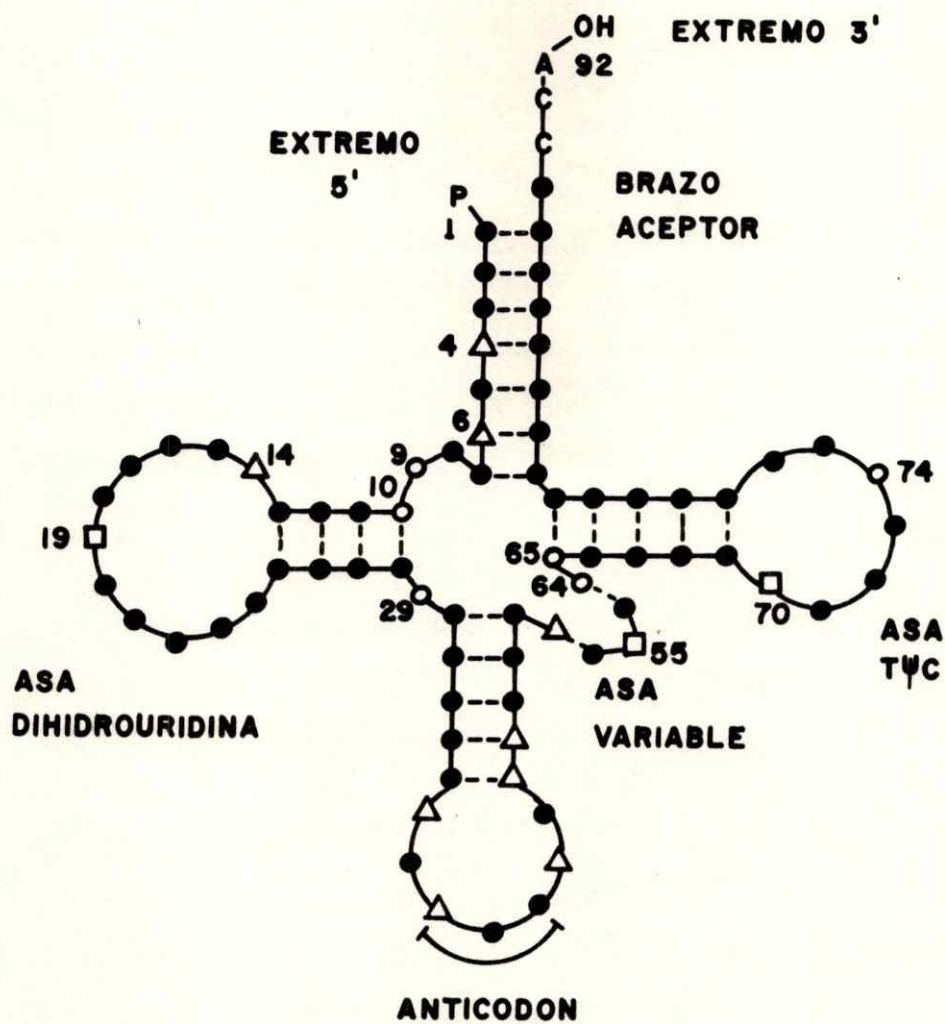
Se ha calculado que los nucleósidos metilados representan entre el 30 al 70% del total de las bases raras o menores y que dependiendo del organismo estudiado, los nucleósidos metilados pueden representar menos de un 3% del total de los nucleótidos en tRNA de micoplasma, aproximadamente el 3% de las bases en bacterias, cerca de un 4% del total en mitocondrias y casi un 10% de todos los nucleótidos en tRNA de eucariotes (29). Esta mayor cantidad de nucleósidos metilados en los tRNA de las células nucleadas queda de manifiesto en la Tabla I y en el Esquema I. (30).

##### 4.3.3.1. La especificidad de las tRNA metil transferasas.

Se ha mencionado que los nucleósidos metilados son de muy variada naturaleza y se encuentran en posiciones determinadas de la secuencia del tRNA. Parecería necesario, por lo tanto, disponer de varias enzimas metilantes con diferente especificidad. La especificidad de las enzimas tRNA metil transferasas debe basarse en un sitio de reconocimiento, es decir, una enzima incorpora grupos metilo en un nucleósido determinado, en un átomo específico de éste, reconociendo ya sea una secuencia del tRNA o una estructura tridimensional.

El estudio de los nucleósidos metilados y de las enzimas se ha realizado "in vivo" e "in vitro". Es justamente a través de estudios "in vitro" de las tRNA metil transferasas como se ha podido adelantar con respecto

ESQUEMA I





ESQUEMA I  
SITIOS DE METILACION

- △ : sitios específicos de metilación en eucariotes.
- : sitios comunes de metilación en eucariotes
- : sitios comunes de metilación en eucariotes y procariotes.

Sitio común de metilación corresponde a la localización donde se encuentra el mismo nucleósido metilado en diferentes especies de tRNA.

Sitio específico de metilación corresponde a la localización donde se pueden encontrar distintos nucleósidos metilados en diferentes especies de tRNA.

El número de los residuos es designado sólo para acomodar todos los datos existentes sobre secuencia de tRNA purificados, según el modelo de hoja trébol de tRNA.

a la especificidad de estas enzimas. Para este estudio generalmente se utiliza un donador de metilos, una fuente de enzima y un tRNA como sustrato aceptor. Dado que resulta difícil obtener el tRNA sustrato apropiado para cada tRNA metil transferasa, generalmente se utiliza como tal, tRNA maduros con bajo nivel de metilación. Habitualmente se utilizan tRNA extraídos de cepas de E. coli RC<sup>rel</sup>met<sup>-</sup> (31). Estas cepas auxotróficas para metionina se caracterizan por no detener la síntesis de RNA estables (tRNA y rRNA) al remover la metionina del medio de cultivo. También se ha utilizado como aceptor a un tRNA total extraído de alguna bacteria mutante en alguna de las tRNA metil transferasas, en este caso el producto de la metilación obtenida "in vitro" al usar tRNA derivado de la mutante y enzima de una cepa silvestre, es idéntico al obtenido "in vivo" (32). Esto indica que la información obtenida por estudios "in vitro" con tRNA y enzima homólogos, resulta ser fisiológicamente significativa.

#### 4.3.3.2. Sustratos donadores de grupos metilo.

La mayoría de las enzimas metilantes de tRNA utilizan S-Adenosil-metionina como donador de metilos, sin embargo, en algunos sistemas como bacterias Gram positivas el sustrato para la metilación de Uridina a ribo Timidina (5 mU o rT) es el 5,10-Metilentetrahidro folato (33).

Mucho se ha especulado con la idea que los grupos metilos están expuestos a un continuo recambio y que las enzimas modificadoras estarían jugando un rol a este ni-



vel dependiendo de las concentraciones del donador de metilos y de los productos desmetilados. Sin embargo, esta idea no se ha podido establecer experimentalmente y la evidencia indica que el catabolismo de las bases metiladas y de los tRNA son paralelos. Esto sugiere que los grupos metilos de las bases menores en el tRNA no están expuestos a un activo recambio.

#### 4.3.3.3. Metilación de nucleósidos y cáncer.

Una característica interesante es que en todos los tipos de células cancerosas examinadas se ha encontrado un gran aumento en la actividad metilante de tRNA con respecto a las células normales correspondientes. Existe un enorme acúmulo de datos "in vitro" e "in vivo" que indica la presencia de bases metiladas adicionales y anormales en células tumorales. Esta hipermetilación de nucleósidos parece corresponder a una inducción de nuevas tRNA metil transferasas con distinta especificidad en los tejidos oncogénicos (34). Algo similar se ha encontrado con tejidos expuestos a agentes cancerígenos alquilantes del tipo dimetil nitrosaminas o dimetil sulfato (35). Sin embargo, hasta el momento no se ha logrado establecer una razón causal de este fenómeno.

#### 4.3.3.4. Significado fisiológico de los nucleósidos metilados.

Aunque se dispone de una gran cantidad de material experimental sobre las enzimas metilantes de tRNA y su mecanismo de acción, poco se sabe sobre el rol fisiológico



que estas modificaciones determinan y sólo existen especulaciones sobre el tema.

Actualmente se dispone de muy pocas mutantes de tRNA metil transferasas a pesar de numerosos intentos en este sentido. Algunas de las mutantes tienen afectadas las enzimas que generan 5 m U (rT) y 1 m G. En ellas se ha podido precisar que la metilación "in vitro" es idéntica a la obtenida "in vivo", lo cual indica que el reconocimiento del tRNA sustrato por la enzima es independiente de si éste está como precursor o como tRNA maduro (36).

Estudios en la mutante de la metilasa de tRNA que convierte la Uridina 70 en 5 m U o rT indican que aparentemente la enzima no afecta el crecimiento de estas cepas como tampoco altera el procesamiento de precursores de tRNA codificados por el fago T<sub>4</sub>. Existe información que el oligonucleótido TψC que contiene esta base metilada y que es común a casi todos los tRNA, sería capaz de inducir la síntesis de los guanosa 3', 5' tetra y penta-fosfatos, los cuales tienen una función pleiotrópica a nivel de la síntesis proteica y de RNA estables (37). Se probó en estos mutantes la capacidad de responder a este fenómeno regulatorio o llamado también fenómeno de estrictez y se encontró que se podía despertar el mecanismo señalado, por lo cual se concluye que la base metilada tampoco sería necesaria para este mecanismo de regulación de la expresión génica (32).

El grupo de Björk ha continuado el estudio de la síntesis de esta enzima, utilizando un tRNA derivado de la mutante y enzima de cepas normales. Se ha podido precisar que el nivel de la tRNA metil transferasa que modifica la Uridina de posición 70, se comporta idéntica respecto a las fluctuaciones de las proteínas y RNA cuando se gatilla el fenómeno de estrictez. Otras enzimas como la metilasa de Guanina en posición 1 por el contrario, no responde a la regulación y el nivel de la enzima es invariable durante el fenómeno de estrictez (38). Esto sugiere que algunas enzimas de procesamiento de tRNA estarían bajo la regulación del mecanismo de estrictez mientras que otras no, lo cual indicaría una regulación no coordinada de las diferentes enzimas participantes en la biosíntesis del tRNA (39).

#### 4.4. Incorporación de la secuencia CCA en el extremo 3' terminal de los tRNA.

Las moléculas de tRNA deben tener en su extremo 3' la secuencia CCA para participar en la biosíntesis de proteínas.

El hidroxilo 2' o 3' de la ribosa de la Adenosina terminal es el aceptor que se esterifica con el aminoácido en la reacción catalizada por las aminoacil tRNA sintetetas (40).

Las moléculas de tRNA son muy estables (41), sin embargo, el extremo 3' de la molécula está expuesto a la acción de nucleasas (42). Se ha encontrado que la célula



la posee un mecanismo capaz de contrarrestar esta degradación y se considera que existe un activo recambio de la secuencia CCA en todos los tRNA (43, 44).

La enzima responsable de la incorporación de los tres nucleótidos en el terminal 3' de los tRNA es la tRNA nucleotidil transferasa. A esta enzima se le ha asignado un rol en la reparación del extremo 3' de los tRNA, pero también se ha demostrado que tendría una participación en la incorporación de la secuencia CCA a precursores de tRNA que no traen esta secuencia desde el transcrito.

Algunos precursores de tRNA tales como el de tRNA<sup>ser</sup> del fago T<sub>4</sub>, no tiene el CCA sino que contiene en su reemplazo la secuencia UAA (45).

Se han encontrado varias mutantes para tRNA nucleotidil transferasa en E. coli y se ha demostrado que las cepas que contienen menos del 15% de la tasa normal de la enzima presentan alteraciones en la velocidad de crecimiento. Mutantes con un nivel del 5% de actividad enzimática son incapaces de procesar correctamente a precursores de tRNA de fagos, lo cual indica que el nivel de la enzima encontrada "in vivo" es muchas veces superior a la requerida para la biosíntesis de tRNA, pero que esta enzima es esencial para el crecimiento celular (46).

Otras confirmaciones para un rol de la tRNA nucleotidil transferasa derivan de datos obtenidos con eucariotes. Al secuenciar genes de tRNA<sup>tyr-phe</sup> de levaduras,



se observó que ellos no contienen una secuencia que codifique para CCA (5, 47). Posteriormente al estudiar la transcripción de los mismos genes se encontró, en los precursores de tRNA correspondientes, la presencia de CCA, lo cual involucra la participación en alguna instancia de procesamiento de una actividad semejante a la tRNA nucleotidil transferasa (48).

Otra función que se postula para la secuencia CCA de los tRNA en bacterias, es la de gatillar el fenómeno regulatorio de estrictez. El grupo de Richter (49) ha demostrado que este sistema regulatorio sólo se activa "in vitro" por la presencia de tRNA desacilado que contiene intacta la secuencia CCA. Esto se ha podido determinar con el uso de mutantes de tRNA nucleotidil transferasa. En un sistema compuesto por poliU, tRNA<sup>phe</sup> carente del último nucleótido AMP en el extremo 3' y en presencia de ATP no se detecta la producción de los nucleótidos ppGpp y pppGpp característicos del fenómeno de estrictez (49).

Se puede concluir que al menos la enzima cumple dos funciones; por un lado la tRNA nucleotidil transferasa repara la secuencia CCA de tRNA maduros y también participa en el procesamiento de tRNA con la incorporación de la secuencia CCA en algunos precursores de tRNA.

Si bien existen dos funciones para una actividad enzimática, es factible pensar que existan isoenzimas específicas para cada función, sin embargo, la evidencia en E. coli indica que existe sólo una enzima de peso mo-

lecular 37.000 (50). Otra información indica que la enzima presenta una amplia especificidad de sustratos, pues reconoce como tales a tRNA maduros y a precursores de tRNA con carácter dimérico.

## 5. EVIDENCIAS QUE PERMITEN POSTULAR UNA SECUENCIA ORDENADA DE EVENTOS O "VIA METABOLICA" EN EL PROCESAMIENTO DE tRNA

### 5.1. Estudios de composición de nucleósidos modificados en precursores de tRNA.

Se ha logrado aislar un importante número de precursores de tRNA que presentan variables grados de hipomodificación en sus bases nitrogenadas y azúcares (51, 52). Estos antecedentes permiten postular que las modificaciones de nucleósidos ocurren en diferentes etapas del procesamiento de los precursores de tRNA.

Algunos ejemplos de precursores de tRNA hipomodificados son el precursor de tRNA<sup>tyr</sup> sup3 aislado a partir de mutantes de RNA<sub>sa</sub> P en E.coli (51). En este precursor se encontraron bajos los niveles de los nucleósidos modificados  $\psi$ , rT, i<sup>6</sup>A y no se detectó la presencia de 2'-O-m G que está presente en el tRNA maduro. Otro sistema muy estudiado es el de los precursores de tRNA diméricos de fago T<sub>4</sub>, que han sido aislados en bacterias mutantes para RNA<sub>sa</sub> P infectadas con dicho bacteriofago (57). Estos precursores de tRNA se encuentran hipomodificados en 2'-O-m U, 2'-O-m C y son carentes totalmente de 2'-O-m G.



Análisis de nucleósidos modificados en eucariotes demuestran que un precursor de tRNA<sup>phe</sup> aislado desde una mutante de procesamiento de levaduras no contiene la base Y y los nucleósidos 2'-O-m C que están en el asa del anticodón en este tRNA maduro, así como tampoco contiene 2 m G y 2'-O-m G en el asa dihidrouridina (48). También el precursor de tRNA<sup>tyr</sup> aislado desde estas mutantes de procesamiento en levaduras, no posee las bases i<sup>6</sup>A y N<sup>2,2</sup> dim G en el asa del anticodón, así como tampoco 2 m G, 5 m C y 2'-O-m G en otras regiones de la molécula (14, 48).

Toda esta información de procariotes y eucariotes sugiere que las enzimas modificadoras actuarían durante la maduración de los diferentes precursores de tRNA y que algunas enzimas de procesamiento como las que generan rT,  $\psi$  del brazo T $\psi$ C, s<sup>4</sup>U y D actuarían temprano inmediatamente después de la síntesis del transcrito primario. Por el contrario otras enzimas modificadoras, tales como las que metilan la ribosa de los nucleósidos, o las que modifican las bases del anticodón y también las enzimas involucradas en la remoción de secuencias intercaladas en eucariotes, deberían actuar en etapas más tardías del procesamiento de tRNA.

## 5.2. Estudios de pulso y caza en metilación de tRNA

Otro enfoque que ha aportado elementos para postular la existencia de una vía metabólica en la maduración de los precursores de tRNA proviene de estudios de pulso



y caza. En estos estudios se detiene la transcripción de nuevos precursores de tRNA con antibióticos y se analiza a diferentes tiempos después de la detención de la síntesis del RNA, la metilación de nucleósidos por marcación con pulsos de metionina radioactiva en el metilo y posterior caza con el aminoácido frío. Aislando moléculas con características de precursores de tRNA se ha podido evidenciar que la metilación ocurriría en tres etapas consecutivas. Las metilasas que reconocerían muy temprano a precursores de tRNA serían las que generan 1 m G, N<sup>2,2</sup> dim G y 7 m G. Existiría otro tipo de metilasas que actuarían en etapas intermedias y serían las que producen 5 m C, 5 m U o RT y 1 m A. Finalmente, las metilaciones más tardías en el procesamiento de los tRNA involucrarían la metilación de las ribosas (53).

La información aportada por este enfoque y el análisis de los nucleótidos en los precursores, coinciden en indicar la existencia de una secuencia de reacciones ordenadas especialmente en el caso de las tRNA metil transferasas que metilan ribosas.

### 5.3. Resultados de procesamiento de tRNA en sistemas heterólogos.

En los últimos años el desarrollo de técnicas artificiales de recombinación genética han permitido aislar genes de tRNA y estudiar la transcripción de ellos en sistemas heterólogos. Algunos ejemplos de esta situación son los estudios realizados por Schmidt y col., con la trans-

cripción de genes de tRNA<sup>lys</sup> de Drosophila "in vitro", usando extractos de núcleos de oocitos X. laevis (54). En este sistema se ha aislado en incubaciones muy cortas, un precursor de tRNA<sup>lys</sup> que se recupera hipomodificado respecto al tRNA maduro en las bases 2 m G, t<sup>6</sup>A, 7 m G, 5 m c y D.

Otra evidencia la presentan De Robertis y Olson con genes de tRNA<sup>tyr</sup> de levaduras y los estudios de Kressmann y col. con los genes de tRNA<sub>i</sub><sup>met</sup> de X. laevis. Estos grupos han estudiado la transcripción de los genes y el procesamiento de los tRNA precursores "in vivo" por microinyección de los genes insertos en plasmidios, a núcleos de oocitos de X. laevis. Se han aislado precursores en diversas etapas de maduración a juzgar por su tamaño, composición de nucleósidos modificados y presencia o ausencia en ellos de la secuencia CCA (55, 56).

Los precursores de tRNA<sup>tyr</sup> encontrados son de 108, 104 y 92 nucleótidos, mientras que el producto maduro contiene sólo 78 nucleótidos.

Los estudios de procesamiento de precursores de tRNA<sup>tyr</sup> de levaduras en oocitos de X. laevis, han permitido aislar más de una molécula precursora y detectar por estos resultados una cierta secuencia de reacciones enzimáticas de procesamiento. Probablemente un estudio más acabado en el análisis de otros nucleósidos modificados sería interesantísimo, pues nos permitiría precisar la etapa de maduración del precursor de tRNA en que actúa ca-



da enzima. De todos modos con la información que se tiene parecería que una etapa muy temprana de procesamiento sería la de remover los oligonucleótidos extra presentes en las puntas 3' y 5', mientras que otras como la incorporación de la secuencia CCA y la metilación de la Citosina de posición 70 a 5 m C en este tRNA sería intermedia en el esquema de maduración.

Por último los resultados también sugieren que la eliminación de la secuencia intercalada existente en la región del anticodón de algunos precursores de tRNA de eucariotes, sería un fenómeno muy tardío.

#### 5.4. Orden de etapas en la génesis de la secuencia CCA en E. Coli.

El grupo de Seidman y Mc Clain ha estudiado extensamente la transcripción y procesamiento del precursor de tRNA dimérico prolina-serina codificado por los fagos T<sub>2</sub> y T<sub>4</sub> con mutantes de RNA<sub>sa</sub> P en la bacteria huésped. El transcrito primario o precursor temprano en T<sub>4</sub> no contiene la secuencia CCA en ninguno de los dos precursores de tRNA, mientras que en el fago T<sub>2</sub> dicho precursor trae codificado desde el genoma la secuencia CCA para el tRNA<sup>ser</sup> que representa el extremo 3' del precursor dimérico. Al comparar el procesamiento de estos dos precursores se podría resumir en varias etapas. La primera enzima en participar sobre el precursor sería una exonucleasa de especificidad 3' que remueve la secuencia incorrecta existente en el lugar del CCA, luego se incorporaría la secuencia



CCA por la tRNA nucleotidil transferasa y al final sería reconocida la estructura resultante como sustrato para la endonucleasa P, la cual elimina segmentos extra en la punta 5' y genera los tRNA<sup>ser</sup> y tRNA<sup>pro</sup> (57).

Otro ejemplo de maduración de precursores de tRNA en etapas es el de tRNA<sup>tir</sup> sup3 de E. coli. Este sistema desarrollado también en bacterias mutantes para RNA<sub>sa</sub> P, se diferencia del precursor dimérico de prolina-serina de T<sub>4</sub> pues trae la secuencia CCA desde el transcrito. Aquí los eventos de procesamiento involucran en la primera etapa la acción de la endonucleasa P que remueve una secuencia extra de 41 nucleótidos en el extremo 5' del precursor. Una vez que se ha generado la punta 5' del producto maduro, operaría la exonucleasa de especificidad 3' que corta un par de nucleótidos distal a la secuencia CCA. Esta enzima tiene características similares a la RNasa D (7).

Se puede concluir entonces que algunos eventos de procesamiento, como son los que involucran endonucleasa P y exonucleasas de especificidad 3' y tRNA nucleotidil transferasa, ocurrirían en un orden preciso de eventos. Sin embargo, al tenor de la información de los sistemas señalados no existiría un esquema universal de procesamiento para diferentes precursores de tRNA, ya que el orden de participación de las enzimas no es el mismo y aparentemente existen exonucleasas de especificidad 3' distintas para precursores que tienen o no la secuencia CCA.

6. ESTUDIO DE ALGUNAS REACCIONES DE PROCESAMIENTO DE tRNA EN OOCITOS DE X. LAEVIS REALIZADAS EN LA PRESENTE TESIS.

La presente tesis describe los estudios realizados sobre dos aspectos del procesamiento de tRNA en oocitos de X. laevis, tales como la metilación de tRNA y la incorporación de la secuencia CCA en el terminal 3'.

El sistema biológico empleado presenta ventajas muy especiales, como ser la posibilidad de microinyectar las células con cantidades apreciables de compuestos definidos y la facilidad con que se pueden remover y limpiar manualmente los núcleos de oocitos. Estas características del sistema nos han permitido dirigir nuestro trabajo hacia la contestación de las siguientes preguntas:

a) ¿Cuál es la distribución en los compartimentos nuclear y citoplasmático de enzimas que participan en el procesamiento del tRNA? Como partes de esta pregunta se pueden plantear los siguientes puntos adicionales:

1. ¿Son iguales las enzimas nucleares y citoplasmáticas que intervienen en la misma reacción?
2. ¿Está la secuencia de reacciones de procesamiento en parte controlada por la distribución de las enzimas que catalizan dichas reacciones?

b) ¿Se puede reparar "in vivo" un tRNA que ha sido microinyectado en el citoplasma de oocitos de anfibio después de remover químicamente uno o dos de los nucleótidos del terminal 3'. Como subpreguntas se pueden agregar las siguientes:

1. ¿Son los requerimientos de la tRNA nucleotidil transferasa estudiada "in vivo" los mismos que los de la enzima descrita en el tubo de ensayo?
2. ¿Son funcionales los tRNA reparados "in vivo"?

A continuación se describen los métodos y resultados obtenidos para enfocar estas preguntas.



## CAPITULO II

### MATERIALES Y METODOS

#### 1. METODOS

##### 1.1. Purificación de tRNA metil transferasas

Las tRNA metil transferasas de ovario de rana X. laevis se purificaron según el Método descrito por Hurwitz y Gold con algunas modificaciones (79). Se homogeneiza 30 g de tejido con 40 ml de una solución que contiene: Tris-HCl 50 mM pH 7,5, KCl 200 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 2 mM y EDTA 0,5 mM. El homogeneizado se centrifuga a 20.000 x g durante 15 minutos y el sobrenadante resultante se somete a una centrifugación a 105.000 x g durante 1 hora. El sobrenadante que se obtiene es sometido a diálisis durante 16 horas contra una solución que contiene: Tris-HCl 20 mM pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 3 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 2 mM y EDTA 0,5 mM. El extracto dializado se somete a una cromatografía de intercambio amiónica en una columna de DEAE-celulosa (5 x 2 cm) equilibrada en la solución utilizada en la diálisis y las actividades metilantes de tRNA se eluyen con una gradiente de concentración de KCl entre 0 y 0,4 M. Se recogen las fracciones con actividad enzimática y se concentran por ultra filtración en membranas "Amicon" y se guardan con glicerol al 30% a -20°.

### 1.2. Ensayo de medición de actividad enzimática de tRNA metil transferasas.

El ensayo de actividad contiene: Tris-HCl 20 mM pH 8,4, KCl 100 mM, EDTA 5 mM, DTT 2 mM, 0,1 mg de tRNA total de E. coli, [<sup>3</sup>H] metil SAM 40 μM de actividad específica 50 Ci/mol y cantidades variables de enzima en un volumen final de 0,1 ml. Se adiciona espermina y Mg<sup>+2</sup> cuando se indica. La reacción se incuba a 37° durante 15 minutos, después de lo cual se detiene con ácido tricloroacético al 5%; la mezcla se filtra y se lava a través de filtros de fibra de vidrio, los que se secan y cuentan en un contador de centelleo líquido con una eficiencia para <sup>3</sup>H de 30%.

Se define la unidad enzimática como la cantidad de enzima capaz de incorporar 1 pmol de grupos metilo a tRNA en 15 minutos a 37°.

### 1.3. Obtención de núcleos y oocitos anucleados.

Los núcleos de oocitos en estado VI de oogénesis (con un diámetro de 1,2 mm) se extraen manualmente según el Método de Brown (80), preincubando previamente los oocitos en una solución que contiene: Hepes 10 mM pH 7,4, KCl 70 mM, MgCl<sub>2</sub> 7 mM, DTT 1 mM y EDTA 0,1 mM. Esta solución es hipotónica respecto a la célula, lo que provoca un aumento de su presión osmótica y se favorece la expulsión del núcleo. Posteriormente se practica una punción superficial en el centro del polo animal del oocito y se aplica una leve presión en



presión con pinzas en el ecuador del folículo, lo que provoca la salida del núcleo. Los núcleos se aíslan del resto de la célula con pipeta Pasteur y se lavan varias veces con la solución descrita anteriormente.

Los oocitos anucleados son aquellas células en las cuales se tiene la certeza de que su núcleo ha salido intacto. Considerando que el proceso de anucleación se hace por aplicación de presión sobre el oocito, generalmente sale también parte del vitelo del citoplasma; este material se ha cuantificado y representa entre el 20 a 30% del total del citoplasma.

#### 1.4. Medición de actividad enzimática para tRNA metil transferasas y tRNA nucleotidil transferasa desde sobrenadantes de núcleos, oocitos anucleados y oocitos enteros.

Se homogeneizan los núcleos, los oocitos anucleados y los oocitos enteros en un mínimo de solución de extracción de los núcleos. Posteriormente se centrifugan los extractos a 20.000 x g durante 15 minutos y el sobrenadante que resulta se relaciona al número de células u organelos. Se mide actividad enzimática según se describe para cada enzima y se utiliza como blanco un ensayo de actividad sin tRNA sustrato exógeno.

#### 1.5. Purificación de tRNA nucleotidil transferasa.

Se purifica la enzima desde ovario de X. laevis por homogeneización de 30 g de tejido con 40 ml de una solución que contiene: Tris-HCl 50 m M pH 7,5, MgCl<sub>2</sub>



10 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 2 mM y sacarosa 200 mM. El homogeneizado se centrifuga a 20.000 x g durante 15 minutos y el sobrenadante que resulta se centrifuga a 105.000 x g durante 1 hora. La fracción soluble de esta centrifugación se precipita con sulfato de amonio entre 40 y 80% de saturación y el precipitado de proteína se resuspende en un mínimo de solución que contiene: Tris-HCl 10 mM pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 1 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 1 mM y EDTA 0,1 mM. Para extraer el exceso de sulfato de amonio se realiza una filtración de la enzima en una columna de Sephadex G-25 (20 x 1,5 cm) equilibrada en la solución de resuspensión de proteína. La fracción de proteína excluida de la filtración en gel se somete a una cromatografía en una columna de DEAE-celulosa (5 x 2 cm) equilibrada en la misma solución anterior.

En estas condiciones la enzima queda retenida y se eluye posteriormente con una gradiente de KCl entre 0 y 0,3 M. La tRNA nucleotidil transferasa eluye con una concentración de KCl de 0,15 M y las fracciones con actividad se concentraron por ultrafiltración a través de membranas "Amicon" y se guardan con 30% de glicerol a -20°.

#### 1.6. Ensayo "in vitro" de medición de actividad enzimática para tRNA nucleotidil transferasa

El ensayo de actividad "in vitro" contiene: Tris-HCl 50 mM pH 9,0, MgCl<sub>2</sub> 10 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 2 mM, [<sup>3</sup>H] CTP 0,6 mM o [<sup>3</sup>H] ATP 4 mM de actividad especí-

fica 20 Ci/mol, 0,3 mg de tRNA total de levadura comercial (Schwarz) que tiene su extremo 3' con un 12% terminado en -CCA, 40% terminado en -CC y un 38% terminado en -C y preparación de enzima variable en un volumen final de 0,1 ml. La mezcla de reacción se incuba durante 15 minutos a 37° y luego se detiene la reacción con ácido tricloroacético a 5%. La mezcla resultante se filtra y se lava a través de filtros de fibra de vidrio, los que se secan y cuentan en un contador de centelleo líquido con una eficiencia de 30% para  $^3\text{H}$ .

Se define una unidad enzimática como la cantidad de enzima necesaria para incorporar 1 pmol de  $[\text{}^3\text{H}]$  AMP o  $[\text{}^3\text{H}]$  CMP a tRNA en 15 minutos a 37°.

#### 1.7. Preparación de tRNA<sup>phe</sup> modificados en su extremo 3'.

Los diferentes tRNA<sup>phe</sup> modificados se preparan según el Método de Daniely Littauer (69), las siguientes etapas:

a) tRNA-CCA<sub>ox</sub>: Se prepara el tRNA oxidado por oxidación de tRNA<sup>phe</sup> con periodato de sodio en una relación de 0,3  $\mu$ moles de periodato/mg de tRNA en una solución que contiene acetato de sodio 50 mM pH 5,0 durante 20 minutos a 20° en la obscuridad. La reacción se detiene con la adición de un exceso de 10 veces de glicerol para eliminar el exceso de periodato que no ha reaccionado. El tRNA<sup>phe</sup> oxidado se recupera por precipitación con dos volúmenes de etanol absoluto.

b) tRNA-CCp: Se prepara por tratamiento del tRNA<sup>phe</sup><sub>ox</sub> por  $\beta$  eliminación con lisina 0,3 M pH 8,0 durante 20 minutos a 20°. El producto corresponde a un tRNA que



ha perdido la Adenosina 3' terminal pero conserva el fosfato. El tRNA se recupera por precipitación con dos volúmenes de etanol absoluto.

c) tRNA-CC: El tRNA resultante del tratamiento anterior se incuba con fosfatasa alcalina bacteriana a una concentración de 0,06 Unidades/mg de tRNA en una solución que contiene: Tris-HCl 100 mM pH 8,5 y MgCl<sub>2</sub> 10 mM durante 90 minutos a 37°. La reacción se detiene con 1 volumen de fenol saturado en agua y agitación violenta. Se centrifuga a 5.000 x g durante 15 minutos y se recupera la fase acuosa. Esta operación se repite dos veces y la última fase acuosa se precipita con dos volúmenes de etanol absoluto. El precipitado se liofiliza y resuspende finalmente en agua.

d) tRNA-C: Este tRNA se prepara por un nuevo ciclo de oxidación,  $\beta$  eliminación y remoción de fosfato consecutivos a partir de tRNA-CC.

### 1.8. Microinyección de tRNA

Se inyectan oocitos de estados V y VI de la oogénesis seleccionados manualmente. El contenido de la inyección se dirige al citoplasma de la célula pues la microinyección se hace en el ecuador del oocito. Se practica la inyección con microagujas calibradas y con un diámetro en su extremo del orden de 5  $\mu$ m. El volumen del tRNA<sup>phe</sup> de 10 mg/ml inyectado varió entre 20 a 50 nl en los diferentes experimentos.



### 1.9. Cuantificación "in vivo" de la tRNA nucleotidil transferasa

El ensayo de actividad de la tRNA nucleotidil transferasa se mide indirectamente por cuantificación de la aminoacilación de tRNA<sup>phe</sup> inyectado en oocitos. Para ello se preincubaron oocitos de estado V y VI de la oogénesis con 20  $\mu\text{M}$  de [ $^{14}\text{C}$ ]-fenilalanina de actividad específica 270 Ci/mol en una solución salina para anfibios durante 2 horas a 21°. Posteriormente se inyectan los oocitos según se explica en la sección anterior en grupos de 5 oocitos en duplicado. Después de la inyección los oocitos se incuban por el tiempo indicado en 50  $\mu\text{l}$  de solución salina para anfibio recién preparada y [ $^{14}\text{C}$ ]-fenilalanina a 21°. La reacción se detuvo por lavado de las células con solución salina para anfibio y con 4 ml de fenol al 50% en una solución que contiene: acetato de sodio 20 mM pH 5,0,  $\text{MgCl}_2$  10 mM, EDTA 1 mM, Tritón X-100 0,1% y 0,1 mg de tRNA total de levadura como aca- rreador. Los oocitos se homogeneizan en la mezcla fé- nólica y la fase acuosa se separa por centrifugación a 5.000 x g durante 15 minutos. Se toman alicuotas de 0,5 ml, las que se precipitan con ácido tricloroacéti- co al 5%. El fenilalanil-tRNA<sup>phe</sup> formado se retuvo en filtros de fibra de vidrio, los que se lavan, secan y cuentan en un contador de centelleo líquido con una eficiencia de 70% para  $^{14}\text{C}$ .

### 1.10. Purificación de tRNA total de hígado y ovario de *X. laevis*.

Se homogenizan en juguera Omni Mixer, 40 g de tejido (hígado u ovario) con 100 ml de fenol saturado en agua y 100 ml de una solución que contiene: Tris-HCl 20 mM pH 7,5, KCl 25 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM y  $\beta$ -mercaptoetanol 5 mM. El material resultante se centrifuga a 20.000 x g durante 15 minutos y el sobrenadante obtenido se trata con dos volúmenes de etanol absoluto.

Después de centrifugar a 20.000 x g durante 30 minutos el extracto etanólico, el precipitado final se resuspende y dializa contra una solución óptima para DNA<sub>sa</sub> I que contiene: Tris-HCl 20 mM pH 7,5, KCl 25 mM, MgCl<sub>2</sub> 20 mM y  $\beta$ -mercaptoetanol 5 mM. El extracto de ácidos nucleicos se digiere con DNA<sub>sa</sub> I a una concentración de enzima de 2  $\mu$ g/ml durante 20 minutos a 37°. Se detiene la reacción con un volumen de fenol saturado en agua y agitación violenta. La fase acuosa obtenida de la extracción fenólica se trata con cloruro de sodio 2 M para hacer precipitar los ácidos ribonucleicos de alto peso molecular. La mezcla salina se centrifuga a 20.000 x g durante 30 minutos y el sobrenadante que resulta se recupera con dos volúmenes de etanol absoluto. El precipitado resultante se resuspende y dializa en una solución de equilibrio de DEAE-celulosa que contiene: Tris-HCl 100 mM pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 10 mM y EDTA 1 mM. El material equilibrado en la solución anterior se somete a una cro-



matografía en DEAE-celulosa. En estas condiciones los ácidos nucleicos son totalmente retenidos en esta resina y se eluyen con una solución semejante a la del lavado, pero con la adición de KCl 1 M. Las fracciones que contienen una absorbancia a 260 nm mayor que 0,1 Unidades se juntan y se llevan a pH 10 con hidróxido de amonio. El material resultante se incuba durante 20 minutos a 37° para desacilar los tRNA de la preparación y se detiene el tratamiento llevando a 0° y cambiando el pH final con acetato de sodio 50 mM pH 5,0. La mezcla se dializa contra agua y se liofiliza.

1.11. Determinación de pesos moleculares de tRNA nucleotidil transferasa y tRNA metil transferasas.

Los pesos moleculares de las tRNA metil transferasas y tRNA nucleotidil transferasa fueron determinadas utilizando una columna de filtración en gel de Sephadex G-200.

La estimación del peso molecular se hizo mediante comparación de los volúmenes de elución de las enzimas de procesamiento de tRNA con las de otras proteínas utilizadas como referencia según el método de Andrews (58). Esta cromatografía se hace en una columna de (65 x 1,5 cm) equilibrada con una solución tampón que contiene: Tris-HCl 20 mM pH 8,0, KCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, β-mercaptoetanol 2 mM y EDTA 0,5 mM.

La concentración de las 6 proteínas de referencia fue de 2 mg/ml y se determina el volumen de elución de

ellas por medición de la absorbancia a 280 nm, excepto para el citocromo c y el azul dextrano los que se detectaron a 414 y 630 nm respectivamente.

La detección de actividad enzimática se hace utilizando 0,1 ml de cada fracción de enzima en un volumen final de 0,15 ml según se describe en los Métodos.

## 2. FUENTE DE LOS MATERIALES

Acetato de sodio	Baker
ácido clorhídrico	Merck
ácido tricloroacético	Merck
ATP	Sigma
[ <sup>3</sup> H] ATP	Amersham
azul dextrano	Pharmacia
citocromo c	Sigma
cloruro de magnesio	Baker
cloruro de potasio	Sigma
cloruro de sodio	Sigma
CTP	Sigma
[ <sup>3</sup> H] CTP	New England Nuclear
DEAE-celulosa	Sigma
DTT	Sigma
DNA <sub>sa</sub> I	Worthington
EDTA-Na <sub>2</sub>	Sigma
etanol	Baker
L-fenilalanina	Sigma
[ <sup>14</sup> C] L-fenilalanina	Amersham





fenol	May-Baker
filtros de fibra de vidrio	Whatman
fosfatasa alcalina bacteriana	Worthington
fosforilasa b	Schwarz Mann
glicerol	Sigma
$\gamma$ -globulina humana	Schwarz Mann
GTP	Sigma
[ <sup>3</sup> H] GTP	New England Nuclear
Hepes	Sigma
hidróxido de amonio	Sigma
lisina	Sigma
membranas ultrafiltración	Amicon
$\beta$ -mercaptoetanol	Sigma
periodato de sodio	Sigma
poli U	Sigma
quimotripsinógeno A	Schwarz Mann
SAM	Sigma
[ <sup>3</sup> H] metil SAM	Amersham
sacarosa	Baker
Sephadex G-25, G-200	Pharmacia
seroalbúmina de bovino	Sigma
Tris (base)	Sigma
tRNA de levadura	Schwarz Mann
tRNA de <u>E. coli</u>	Calbiochem
tRNA <sup>phe</sup> de levadura	Boehringer
Triton X-100	Sigma
UTP	Sigma
[ <sup>3</sup> H] UTP	New England Nuclear

Amersham: The Radiochemical Centre Amersham, Inglaterra  
Amicon: Amicon Corporation, Lexington, Mass., U.S.A.  
Baker: Baker Chemical Co. Phillipsburg, N.J. U.S.A.  
Boehringer: Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania  
Calbiochem: Calbiochem, San Diego, California, U.S.A.  
May Baker: May-Baker Ltd. Dagenham, Inglaterra  
Merck: Merck, Darmstadt, Alemania  
New England Nuclear: New England Nuclear, Boston, Mass.,  
U.S.A.  
Pharmacia: Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia  
Schwarz Mann: Schwarz Mann Res, Orangeburg, N.Y., U.S.A.  
Sigma: Sigma Chemical Company, St. Louis, U.S.A.  
Whatman: Whatman, W. and R. Balston Ltd., Inglaterra  
Worthington: Worthington Biochemical Co. N.J., U.S.A.



## CAPITULO III

### RESULTADOS

#### 1. CARACTERIZACION DE ALGUNAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS QUE PARTICIPAN EN EL PROCESAMIENTO DE tRNA EN OOCITOS DE X. LAEVIS.

##### 1.1. tRNA nucleotidil transferasa

La tRNA nucleotidil transferasa es una enzima cuya actividad se mide por la incorporación de CMP y/o AMP radioactivo a tRNAs que carecen total o parcialmente de la secuencia CCA en su extremo 3'.

##### 1.1.1. Purificación parcial de la tRNA nucleotidil transferasa.

La tRNA nucleotidil transferasa se purificá parcial mente a partir de una fracción sobrenadante obtenida después de centrifugar un homogeneizado de ovario a 105.000xg por 1,5 horas. Con este sobrenadante se realizó un frac cionamiento eromatográfico en columna de DEAE-celulosa eluída con un gradiente de KCl. La actividad enzimática es retenida en la columna en la solución inicial y eluye como un solo pico a una concentración de KCl de 0,15 M (Figura 1). Las fracciones con actividad enzimática se concentran mediante ultrafiltración y se guardan en presencia de glicerol al 30% a -20° para ser utilizadas en los estudios de caracterización de esta enzima.

FIGURA 1

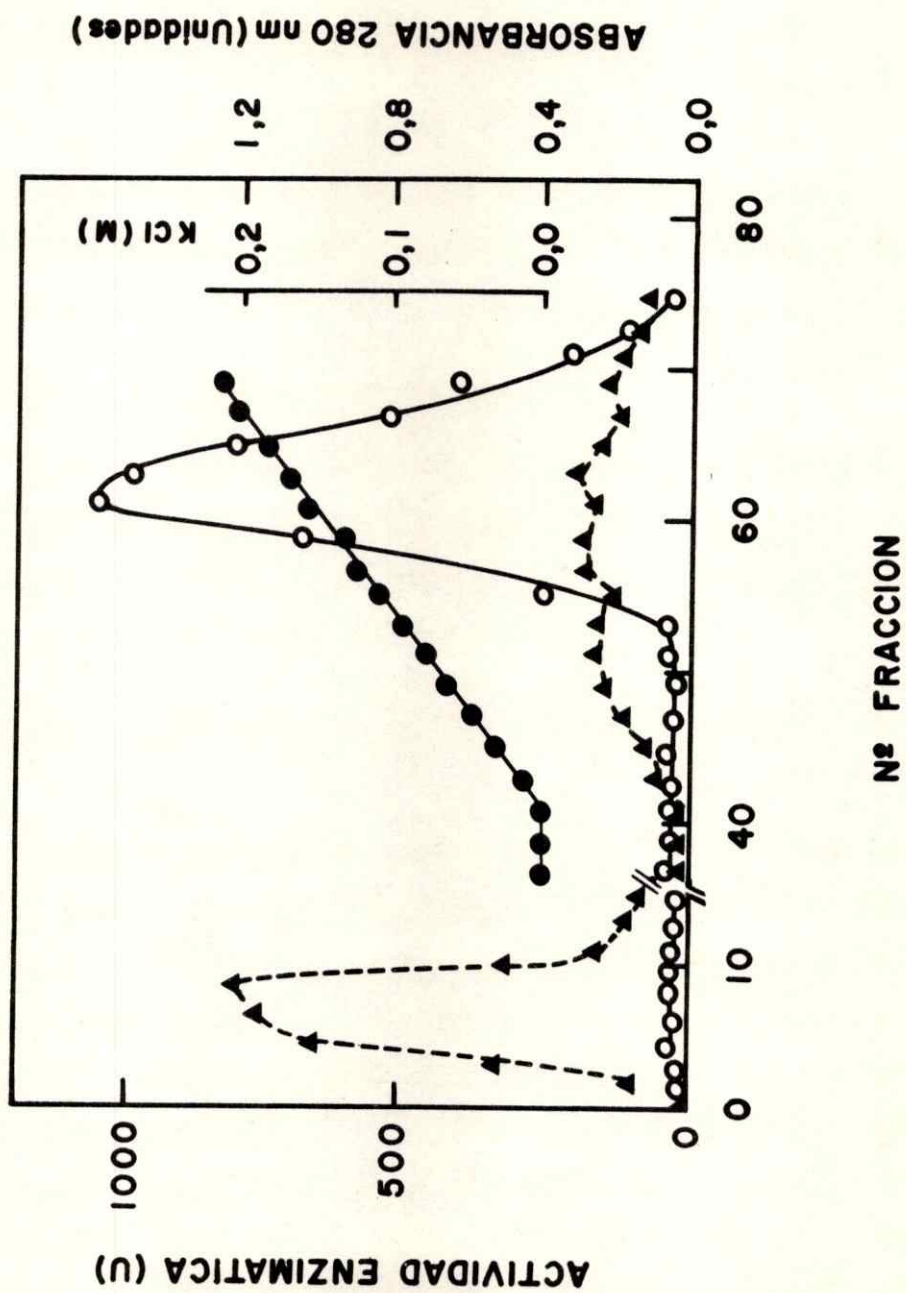


Figura 1. Purificación parcial de la tRNA nucleotidil transferasa de ovario de X. laevis por cromatografía en DEAE-celulosa.

Se cromatografía un sobrenadante de 105.000 x g proveniente de 30 g de ovario en las condiciones descritas en Métodos. Las enzimas se eluyen con una gradiente salina de KCl. Se recogen fracciones de 2 ml y se toman alícuotas de 0,1 ml para medir actividad enzimática en un volumen final de 0,15 ml en idénticas condiciones a las descritas en Métodos.

(---▲---▲---)      absorbancia a 280 nm  
(—●—●—)      KCl (M)  
(—○—○—)      actividad enzimática



### 1.1.2. Caracterización de la tRNA nucleotidil transferasa parcialmente purificada desde ovario.

Para estudiar los requerimientos de la enzima se midió la reacción enzimática usando los nucleótidos trifosfatos [ $^3\text{H}$ ] ATP y [ $^3\text{H}$ ] CTP como sustratos y tRNA total de levadura hidrolizado parcialmente en el extremo 3' terminal con 40% terminado en -CC y 38% terminado en -C, como se pudo determinar por la capacidad aceptora de CMP y AMP, catalizada por la tRNA nucleotidil transferasa de ovario.

En la Tabla II se observa que cuando se utiliza CTP como sustrato la enzima es totalmente dependiente de tRNA hidrolizado en su extremo 3' y  $\text{Mg}^{+2}$ . Por otro lado si se reemplaza el tRNA hidrolizado de levadura por tRNA de oocitos o poli U no se observa incorporación de CMP. La adición de RNA<sub>sa</sub> pancreática al sistema completo logra inhibir la incorporación a material insoluble en ácido, lo cual demuestra que se trata de una incorporación a RNA.

Cuando se utiliza  $^3\text{H}$  ATP y tRNA de levadura hidrolizado en el extremo 3' como sustratos, se observa una considerable incorporación de [ $^3\text{H}$ ] AMP. En este caso, al usar tRNA de oocito de *X. laevis* como aceptor, se detecta una apreciable incorporación de [ $^3\text{H}$ ] AMP a diferencia de lo que ocurre al usar [ $^3\text{H}$ ] CTP como sustrato con el mismo aceptor. Estos datos sugieren que el tRNA de oocito contiene una fracción de tRNA, cuyo terminal 3' carece de Adenosina, pero no de residuos de Citosina, teniendo por lo tanto, la secuencia-CC. También se observa en esta Tabla II que la enzima es parcialmente estimulada por espermina, aunque el polication no logra reemplazar los requerimientos de  $\text{Mg}^{+2}$  en la reacción.

TABLA II

Requerimientos de la tRNA nucleotidil transferasa de ovario de X. laevis

Nucleótido sustrato	Condiciones	Actividad enzimática (Unidades)
$[^3\text{H}]$ CTP	Sistema completo	720
	Más espermina	1.190
	Menos $\text{MgCl}_2$	61
	Menos $\beta$ -mercaptoetanol	520
	Menos tRNA	30
	Menos tRNA	
	+ tRNA oocito	70
	Menos tRNA + poli U	54
	Completo + RNA <sub>sa</sub>	45
$[^3\text{H}]$ ATP	Sistema completo	1.060
	Más espermina	1.705
	Menos $\text{MgCl}_2$ + espermina	193
	Menos tRNA	40
	Menos tRNA	
	+ tRNA oocito	320
$[^3\text{H}]$ GTP	Sistema completo	38
$[^3\text{H}]$ UTP	Sistema completo	270

## TABLA II

El sistema completo de la reacción contiene:

Tris-HCl 50 mM pH 9,0; MgCl<sub>2</sub> 10 mM, β-mercaptoetanol 2 mM; [<sup>3</sup>H] nucleótido trifosfato 3 mM, 150 µg de enzima purificada desde DEAE-celulosa y 0,3 µg de tRNA total de levadura. Cuando se reemplaza el tRNA de levadura por otro RNA, se usa una cantidad equivalente de tRNA total de oocito o poli U. Se usa RNA<sub>sa</sub><sup>A</sup> durante la incubación a una concentración de 0,1 µg/ml. Se usa una cantidad de espermina de 2 mM.



Cuando se usa [ $^3\text{H}$ ] GTP en vez de [ $^3\text{H}$ ] CTP o [ $^3\text{H}$ ] ATP, se observa que este nucleótido no es sustrato de la tRNA nucleotidil transferasa. Sin embargo, se observa una considerable incorporación de [ $^3\text{H}$ ] UMP cuando se usa [ $^3\text{H}$ ] UTP como sustrato (Tabla II). Esto indica que la tRNA nucleotidil transferasa de ovario presenta la misma característica de otras tRNA nucleotidil transferasas de incorporar UMP a tRNA (59).

### 1.1.3. Determinación del peso molecular de la tRNA nucleotidil transferasa.

La determinación de peso molecular de la tRNA nucleotidil transferasa se hace por filtración en gel utilizando la resina Sephadex G-200 (Figura 2).

Al filtrar la fracción enzimática parcialmente purificada por DEAE-celulosa, en una columna de Sephadex G-200 (65 x 1,5 cm) equilibrada con una concentración 0,15 M de KCl, la actividad enzimática eluye en dos componentes de 40.000 y 80.000 (Figura 2A).

En cambio, si la columna de Sephadex se equilibra con una solución de baja fuerza iónica y 0,02 M de KCl, la actividad enzimática eluye como una sola entidad de peso molecular 80.000 (Figura 2B). Para determinar si la forma pesada resulta de una asociación de la forma liviana, se aisló una fracción de la forma liviana y se filtró nuevamente a través de la misma columna en condiciones de baja fuerza iónica. En la Figura 2C, se observa que la enzima eluye como forma pesada, lo cual sugiere que

FIGURA 2

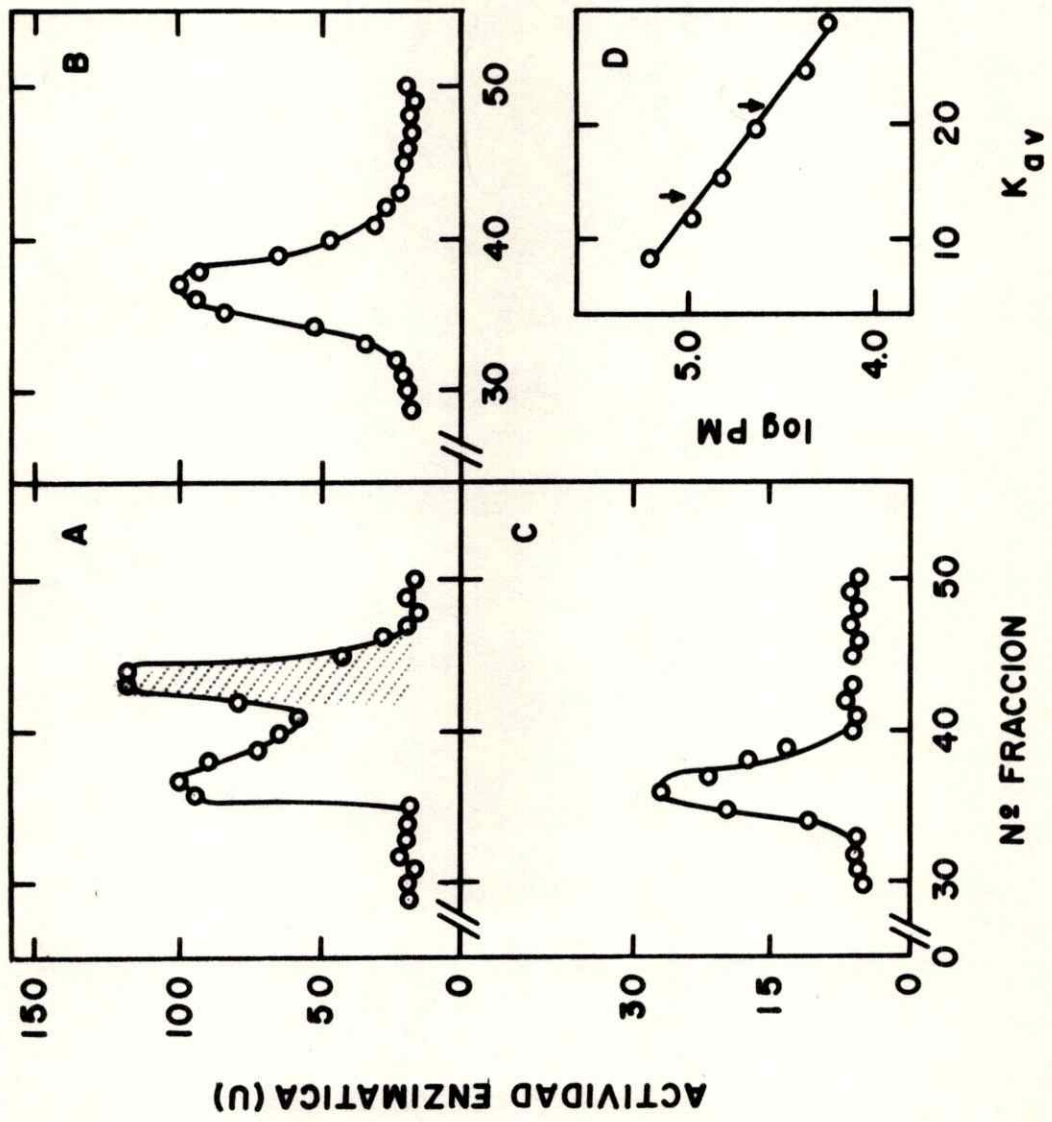


Figura 2. Determinación de peso molecular de la tRNA nucleotidil transferasa de ovario de X.laevis

Se filtra en una columna de Sephadex G-200, 740  $\mu$ g de una preparación que contiene tRNA nucleotidil transferasa parcialmente purificada en DEAE-celulosa en distintas condiciones:

En A se filtró la enzima con una solución que contenía: Tris-HCl 20 mM pH 8,0; KCl 150 mM; MgCl<sub>2</sub> 3 mM;  $\beta$ -mercaptoetanol 2 mM y EDTA 0,5 mM.

En B se filtró igual cantidad de enzima a la usada en el experimento A, excepto que la solución utilizada contiene 20 mM en vez de 150 mM de KCl.

En C se refiltró en Sephadex G-200 en las condiciones del experimento B, la forma liviana que aparece marcada en el experimento A.

Las muestras se filtraron a través de la columna con un flujo de 9 ml/hr, se recogieron fracciones de 2,5 ml y se determinó la actividad enzimática en alícuotas de 0,1 ml en un volumen final de 0,15 ml según condiciones descritas en Métodos.

En D se muestra la calibración de la columna de Sephadex G-200 con las siguientes proteínas marcadoras como referencia:  $\gamma$  globulina humana (160.000), fosforilasa b (94.000), seroalbúmina de bovino (67.000), ovoalbúmina (45.000), quimotripsinógeno A (23.000) y citrocromo c (12.500). Las flechas indican el volumen de elución de las formas liviana y pesada de tRNA nucleotidil transferasa.



la tRNA nucleotidil transferasa de oocito puede existir en dos formas de peso molecular alrededor de 40.000 y 80.000 y que en condiciones de alta fuerza iónica tendería a disociarse a la forma de bajo peso molecular.

La columna de Sephadex G-200 utilizada para determinar peso molecular se calibró con seis proteínas globulares de peso molecular conocidos;  $\gamma$  globulina humana, fosforilasa b, seroalbúmina de bovino, ovoalbúmina, quimotripsinógeno A y citocromo c (Figura 2 D).

#### 1.1.4. Determinación de constantes cinéticas de la reacción de incorporación de CMP y AMP a tRNA catalizada por la tRNA nucleotidil transférasa.

En la Figura 3 se muestran graficas de Lineweaver y Burk para expresar el efecto de las concentraciones de CTP y ATP sobre la velocidad de incorporación de los nucleótidos monofosfato al tRNA. Se observa que la enzima presenta un  $K_M$  aparente de 0,2 mM para CTP y de 2,0 mM para ATP. Cabe destacar que estos valores de  $K_M$  son muy similares a los descritos para la tRNA nucleotidil transferasa purificada de otros sistemas de eucariontes (60).

El valor relativamente alto de  $K_M$  para ATP podría explicar el hecho de que en el oocito exista una población de tRNA igual a 12% del total que carece de AMP 3' terminal como se observó en la Tabla II. Además se ha encontrado que la concentración de ATP en el oocito si se supone que el nucleótido se encuentra homogénea-

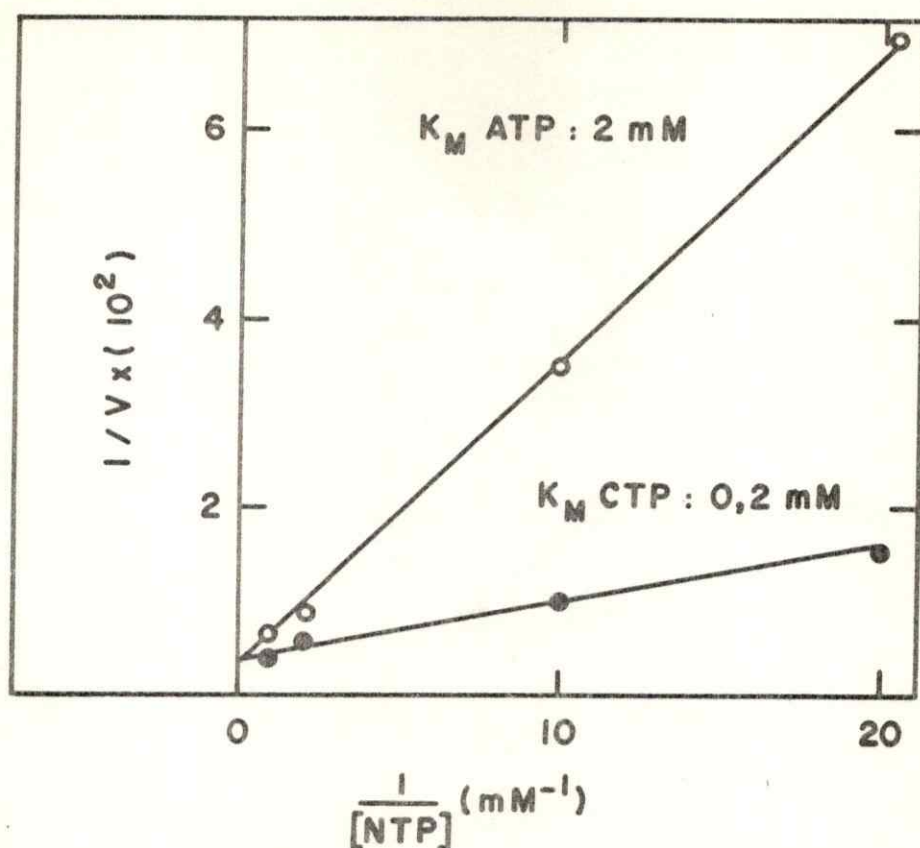


Figura 3. Efecto de la concentración de ATP y CTP en la velocidad de reacción de la tRNA nucleotidil transferasa de ovario de X. laevis.

Una cantidad de proteína que contenía 32  $\mu\text{g}$  de tRNA nucleotidil transferasa parcialmente purificada desde DEAE-celulosa se ensayó para medir actividad enzimática según Métodos. La medición se hace utilizando las condiciones descritas en Métodos. Como sustrato se usó tRNA de levadura hidrolizado en su extremo 3' y ATP o CTP.

mente distribuido en la célula, sería de 1,0 mM (61).

Parece posible entonces con los datos expuestos que la tRNA nucleotidil transferasa es incapaz de reparar totalmente al tRNA del oocito en su extremo 3' por tener la enzima una alta  $K_M$  para ATP y porque la concentración del nucleótido dentro de la célula sería limitante.

## 1.2. tRNA metil transferasas

Las tRNA metil transferasas son enzimas que catalizan la incorporación de grupos metilos a bases nucleotídicas y azúcares del tRNA utilizando como donador de metilos a S-Adenosil-L-metionina.

### 1.2.1. Identificación de un tRNA sustrato para la tRNA metil transferasa de oocitos.

Con el propósito de tener un tRNA como sustrato aceptor de metilos para detectar la actividad enzimática de las tRNA metil transferasas de oocitos de X. laevis, se prueban tRNAs de diversos orígenes. En la Tabla III se muestra que el mejor aceptor de grupos metilos es el tRNA de E. coli B. Los tRNA de levadura y germen de trigo también presentan incorporación de grupos metilos aunque en menor proporción. En cambio el tRNA de oocito o el de hígado de X. laevis prácticamente no incorporan grupos metilo con esta enzima. Estos resultados no son sorprendentes pues los tRNA homólogos ya están probablemente totalmente metilados en los sitios específicos para estas enzimas al haber estado expuestos a las mismas



TABLA III

Capacidad aceptora de grupos metilo en tRNA de diverso origen.

Origen del tRNA	Actividad enzimática (Unidades)
<u>E. coli</u> B	28,6
germen de trigo	6,6
levadura	6,3
hígado <u>X. laevis</u>	2,4
oocitos <u>X. laevis</u>	0,7
poli U	0,4
rRNA <u>X. laevis</u>	0,8
DNA timo ternera	1,5

Se midió la capacidad aceptora de grupos metilo por incubación de 0,15 mg de los RNA señalados con 210 µg de proteína proveniente de un líquido sobrenadante de 105.000 x g de ovario, según las condiciones descritas en Métodos.

actividades dentro de la célula previo su aislamiento. El hecho que tRNA total de hígado de X. laevis, levadura y germen de trigo, puedan aceptar grupos metilos, indica que existen algunos sitios de incorporación disponibles en estos tRNA. Este resultado sugiere además que el grupo de tRNA metil transferasas es diferente en distintas células y tejidos de eucariontes.

### 1.2.2. Análisis del tRNA metilado por las tRNA metil transferasas de oocito.

Existen evidencias que indican que el compuesto dador de metilos (SAM) es inestable en medios neutro y levemente alcalinos (62). En esas condiciones SAM se hidroliza para entregar de preferencia metionina, adenosina y cabía la posibilidad, por lo tanto, que la radioactividad incorporada al tRNA se debiera a una aminoacilación de metionina al tRNA en vez de la transferencia de grupos metilos.

Para determinar la naturaleza de la marca incorporada al tRNA se analiza el producto radioactivo por hidrólisis ácida, tratamiento de desacilación e hidrólisis con RNA<sub>sa</sub> pancreática. En la Tabla IV se observa que la radioactividad asociada a tRNA no es removida del material ácido insoluble por un tratamiento de desacilación a pH alcalino. En estas condiciones es posible hidrolizar el enlace éster del metionil-tRNA. Sin embargo, esta marca se pierde por tratamiento ácido en caliente o incubación con RNA<sub>sa</sub> pancreática. Se demuestra entonces

TABLA IV

Estudio de la marca incorporada a tRNA por incubación de enzima de X. laevis y [<sup>3</sup>H] metil SAM

Condiciones	cpm insoluble en ácido
Control	3.080
Hidrólisis ácida (pH 1,5 a 80°, 2 hr)	27
RNA <sub>sa</sub> A (0,1 µg/ml a 37°, 1 hr)	68
Desacilación (pH 8,5 a 37°, 2 hr)	2.900

Se preparó tRNA metilado en las condiciones de ensayo descritas en Métodos con 2,3 mg de un líquido sobrenadante de ovario centrifugado a 105.000 x g como fuente de enzima y 1,5 mg de tRNA de E. coli B. El RNA se recupera con dos extracciones sucesivas con fenol y se tratan alícuotas de este material en las condiciones descritas. Por último se cuantifica la radioactividad insoluble en ácido como se menciona en Métodos.



que el material precipitable por ácido corresponde realmente a metilación de tRNA.

### 1.2.3. Purificación parcial de las tRNA metil transferasas de ovario de X. laevis.

Se purificaron las tRNA metil transferasas a partir de un extracto proveniente de un líquido sobrenadante de ovario centrifugado a 105.000 x g durante 1,5 horas. Esta fracción se sometió a cromatografía en una columna de DEAE-celulosa que se eluyó con una gradiente salina. En la Figura 4 se observan dos fracciones con actividad metilante de tRNA que eluyen a concentraciones de 0,1 y 0,15 M de KCl respectivamente. Estas dos actividades presentaron distinto comportamiento en presencia de espermina; la fracción I fue notoriamente activada mientras que la fracción II no fue modificada en su actividad por este compuesto. Se utilizó esta polimerización, dado que espermina sería un potente activador de varias tRNA metil transferasas de otras fuentes (63).

### 1.2.4. Caracterización de las fracciones I y II de tRNA metil transferasas de ovario.

Con el propósito de caracterizar ambas fracciones cromatográficas de las tRNA metil transferasas, se estudiaron los requerimientos de sales, espermina y  $Mg^{+2}$ . En la Figura 5 A se observa que la fracción I, es decir, la enzima que eluye a 0,1 M de KCl, es totalmente depen-

FIGURA 4

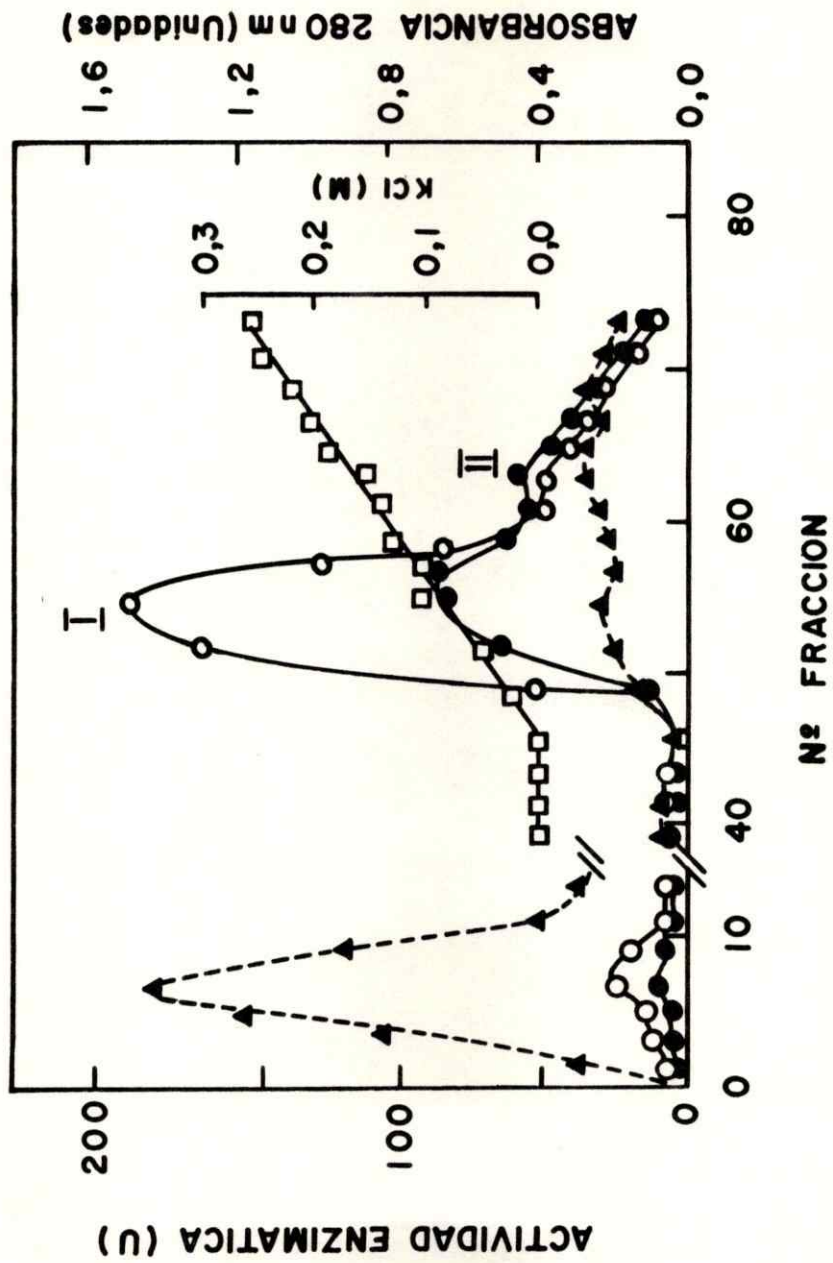


Figura 4. Fraccionamiento y purificación parcial de las tRNA metil transferasas de ovario de X.laevis por cromatografía en DEAE-celulosa.

Se cromatografió un líquido sobrenadante de 105.000 x g proveniente de 30 g de ovario preparado como se describe en Métodos. Las enzimas se eluyeron con un gradiente de KCl. Se recogen fracciones de 2 ml y se toman alícuotas de 0,1 ml para medir actividad enzimática en un volumen final de 0,15 ml según las condiciones descritas en Métodos.

- (---▲---▲---) absorbancia a 280 nm
- (—□—□—) KCl (M)
- (—○—○—) actividad enzimática en presencia de espermina 0,4 mM.
- (—●—●—) actividad enzimática en ausencia de espermina.



diente de KCl en el ensayo y es activada por  $Mg^{+2}$  a bajas concentraciones de sal. Algo similar se observa en la Figura 5B en donde se observa que la fracción es activada también por espermina a bajas concentraciones de KCl. También se observa que los cationes ensayados logran disminuir los requerimientos de sal en su actividad enzimática. Estos resultados están de acuerdo con resultados descritos para otras enzimas que utilizan tRNA como sustrato (64) (65).

Cuando se analiza el efecto de KCl sobre la actividad enzimática de la fracción II de la tRNA metil transferasa (Figura 6), se observa que la enzima posee un requerimiento de KCl similar a la fracción I. Sin embargo, existen importantes diferencias entre las fracciones enzimáticas con respecto al efecto de espermina. A bajas concentraciones de sal, la enzima II muestra una pequeña activación por espermina, pero a concentraciones por sobre 0,05 M de KCl, el polication es fuertemente inhibitorio. Parece probable que la leve activación a bajas concentraciones de sal podría deberse a una contaminación de la fracción II con la fracción I.

#### 1.2.5. Caracterización cinética de las tRNA metil transferasas I y II de ovario.

Como una manera de conocer algunos datos cinéticos de estas actividades metilantes de tRNA, se estudian las enzimas frente a los sustratos tRNA y SAM.

FIGURA 5

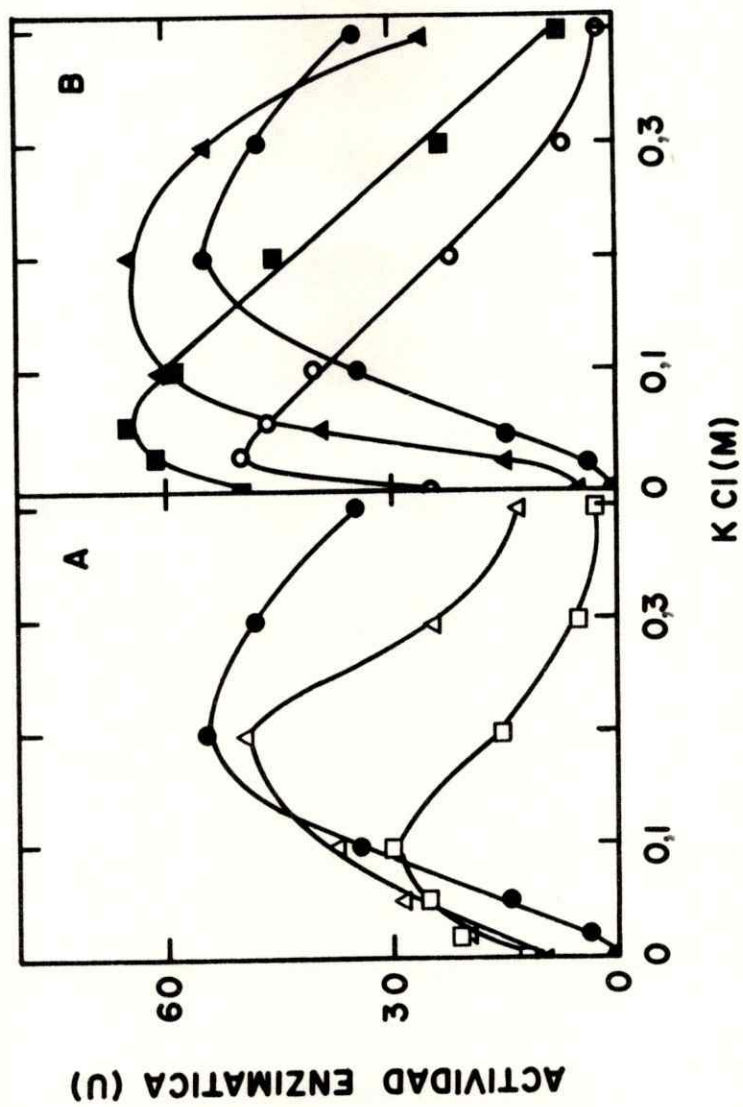


Figura 5. Actividad de la tRNA metil transferasa I en presencia de los iones  $Mg^{+2}$ , espermina y KCl.

Se mide actividad enzimática de la tRNA metil transferasa I (18  $\mu g$  de proteína), preparada como se describe en Métodos y dializada en una solución exenta de KCl. La actividad se determinó como se describe en Métodos, excepto que no se agregó EDTA cuando se ensayó en presencia de  $Mg^{+2}$ .

En A se muestra la dependencia de KCl a distintas concentraciones de  $Mg^{+2}$ : (—●—●—) ausencia de  $Mg^{+2}$ , (—△—△—) 1 mM y (—□—□—) 3 mM.

En B se muestra la dependencia de KCl en presencia de espermina a las siguientes concentraciones: (—●—●—) ausencia de espermina, (—▲—▲—) 0,1 mM, (—■—■—) 0,4 mM y (—○—○—) 1 mM.



FIGURA 6

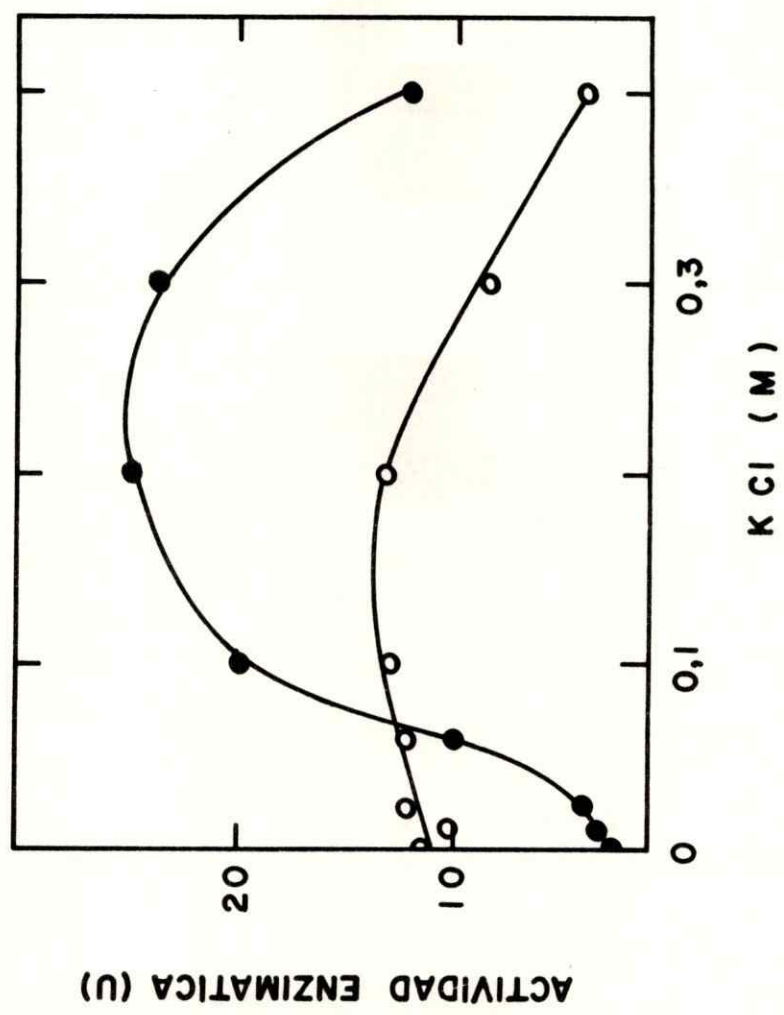


Figura 6. Actividad de la tRNA metil transferasa II en presencia de espermina y KCl.

Se mide actividad enzimática de la tRNA metil transferasa II (82 ug de proteína), preparada como se describe en Métodos y dializada en una solución exenta de KCl. La actividad se determina como se describe en Métodos.

( —○—○— )

actividad enzimática en presencia de espermina 0,4 mM.

( —●—●— )

actividad enzimática en ausencia de espermina.

En la Figura 7 se muestran los resultados obtenidos para el sustrato tRNA. Se observa que ambas fracciones de enzima presentan  $K_M$  aparente similar para tRNA total de E. coli del orden de  $3 \mu\text{M}$ . Sin embargo, al estudiar la fracción de enzima I se observa que la presencia de una concentración óptima de espermina, causa un aumento de 4 a 5 veces en la velocidad máxima de la reacción, sin modificar el valor de  $K_M$ .

Cuando se analizan las constantes cinéticas para el donador de metilos SAM, se observa en la Figura 8 que la fracción I de enzima presenta un componente con  $K_M$  de  $2,5 \mu\text{M}$ , mientras que la fracción II tiene dos componentes con  $K_M$  de  $3,3 \mu\text{M}$  y  $16,6 \mu\text{M}$ . Al tenor de estos resultados y de los encontrados por los efectos de KCl en la actividad enzimática, parecería que la fracción II estaría parcialmente contaminada con la fracción I de enzima. Por lo tanto se podría sugerir que la fracción I tiene una  $K_M$  para SAM de  $2,5 \mu\text{M}$  y la fracción II tendría una  $K_M$  de  $16,6 \mu\text{M}$ .

Se han hecho intentos para purificar aún más la fracción II de enzima por recromatografía en DEAE-celulosa. En estas condiciones se logró recuperar una considerable cantidad de enzima I, sin embargo, la fracción de enzima II obtenida de esta recromatografía no se diferencia sustancialmente de la enzima inicial, lo que se determina por criterios de comportamiento ante KCl y espermina. Además, tanto las fracciones I como II de enzima son bastante inestables, lo cual hace difícil realizar posterior-



FIGURA 7

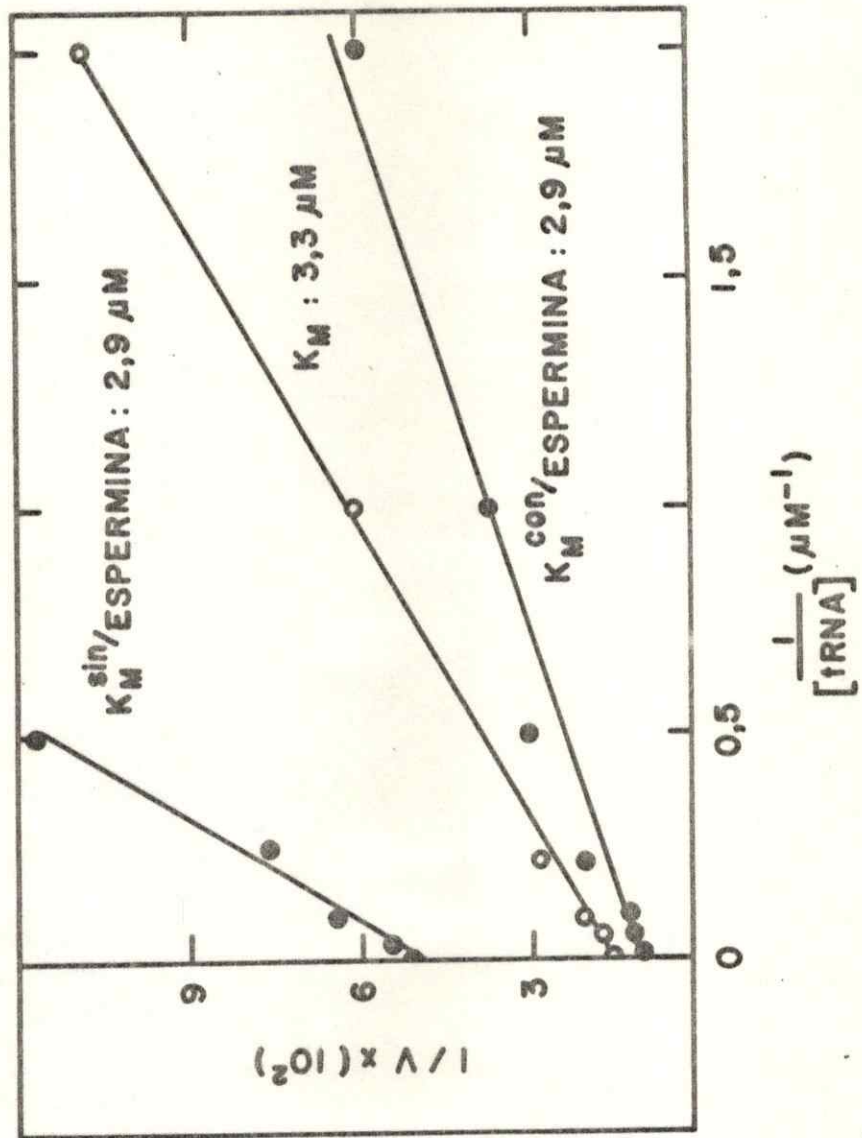


Figura 7. Efecto de la concentración de tRNA sobre la velocidad de las tRNA metil transferasas I y II de ovario de X. laevis.

Se midieron las  $K_M$  aparentes de las enzimas I y II para tRNA, utilizando 21 y 105  $\mu\text{g}$  de proteína respectivamente según las condiciones descritas en Métodos. La concentración de espermina usada para medir actividad enzimática de la tRNA metil transferasa I es de 0,4 mM y la tRNA metil transferasa II se mide en ausencia de espermina.

(—●—●—) tRNA metil transferasa I  
(—○—○—) tRNA metil transferasa II



FIGURA 8

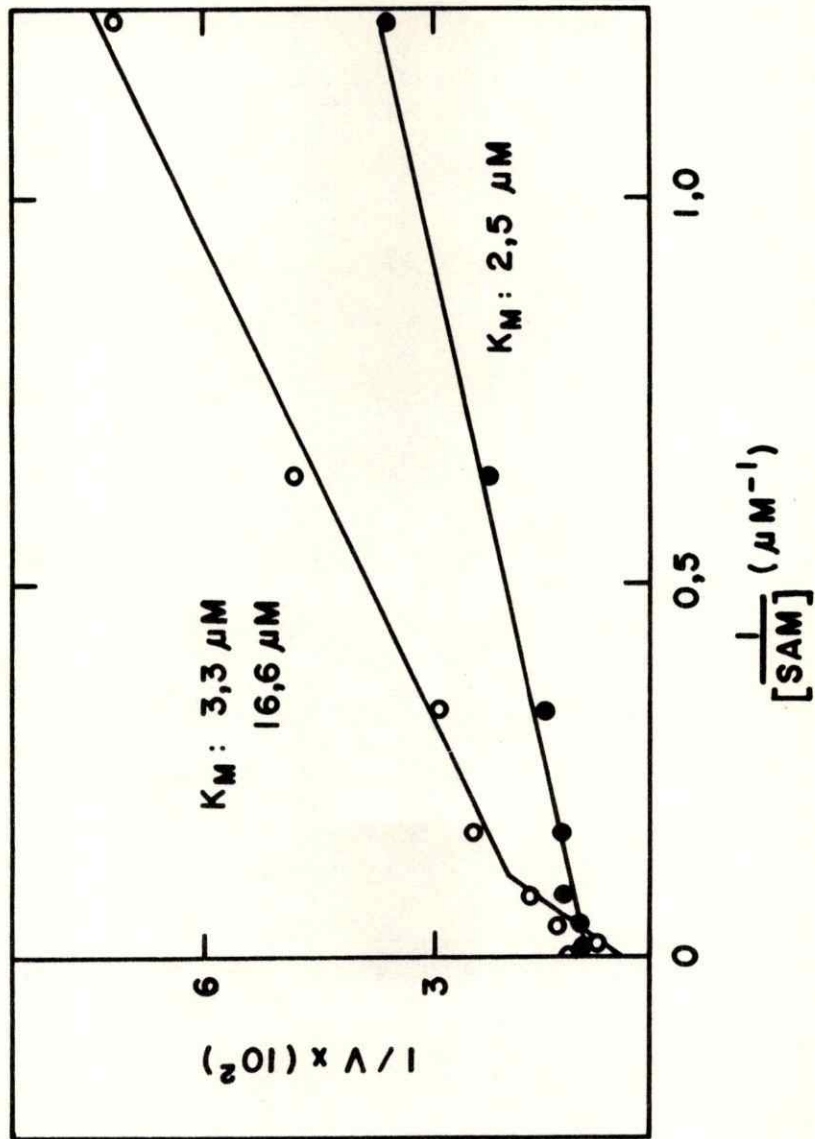
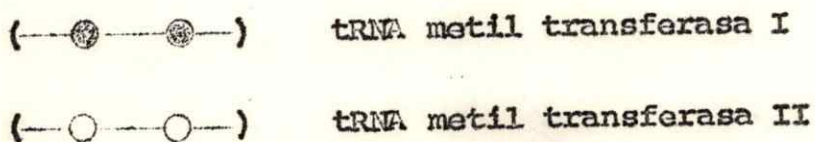




Figura 8. Estudio de las constantes cinéticas de las tRNA metil transferasas I y II para el donador de metilos SAM.

Se mide la actividad enzimática de la tRNA metil transferasa I con 21  $\mu$ g de proteína en presencia de 0,4 m M de espermina tal como se describe en Métodos. Para la tRNA metil transferasa II se usa 105  $\mu$ g en idénticas condiciones a la anterior, excepto que no se agrega espermina.



res etapas de purificación.

#### 1.2.6. Especificidad sustrato de las tRNA metil transferasas I y II de ovario.

Con el propósito de explorar la especificidad sustrato de las fracciones I y II fraccionadas en DEAE-celulosa, se utilizan dos tipos de tRNA purificados de E. coli, tRNAs específicos para valina y para fenilalanina. En la Figura 9 se muestra la distinta capacidad aceptora de grupos metilos en ambos tRNA cuando se utilizan las dos fracciones de enzima. Mientras la fracción I reconoce como sustrato preferencial a tRNA<sup>val</sup>, la fracción II presenta una leve preferencia por el tRNA de fenilalanina. También es interesante destacar de estos resultados, que la espermina no estimula la reacción y por consiguiente no afecta el grado de metilación de éstos. Sin embargo, la espermina causa un importante estímulo del grado de metilación catalizada por la enzima I cuando se utiliza tRNA total de E. coli (Figura 10). La estimulación causada por la poliamina es evidente en todo el rango de concentraciones del tRNA que se ensaya. Estos resultados sugieren que el polication debe tener efecto a nivel de alguna(s) especie(s) de tRNA distintas a las de tRNA<sup>phe</sup> y tRNA<sup>val</sup>, las cuales aceptan un mayor número de metilos cuando se usa espermina. Es interesante mencionar que estos datos de nivel de metilación en tRNA total de E. coli, permiten corroborar los obtenidos en la Figura 7, en donde se observa que el polication logra producir un aumento considerable en la Velocidad máxima de esta reacción.

#### 1.2.7. Determinación de Peso Molecular de las tRNA metil transferasas I y II de ovario.

FIGURA 9

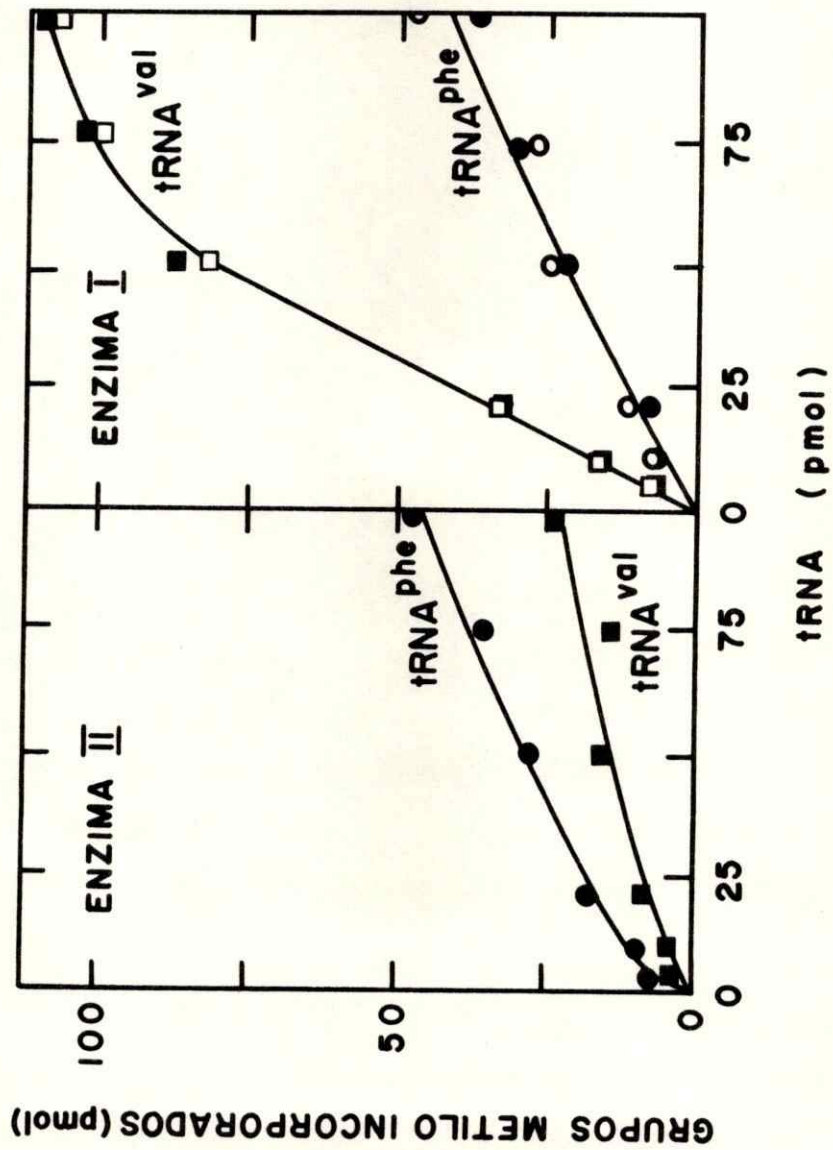




Figura 9. Capacidad aceptora de grupos metilo de tRNA purificados de E. coli catalizada por las tRNA metil transferasas I y II de ovario de X. laevis.

La incubación se realiza igual que la determinación de actividad enzimática descrita en Métodos, excepto que el tRNA se usa en cantidades limitantes como se muestra en la figura. La cantidad de tRNA metil transferasa I y II usada es de 15 y 80  $\mu$ g respectivamente. En la enzima I se agrega espermina en una relación entre 10 a 150 moles de espermina/mol de tRNA y en la enzima II no se agrega espermina.

Los tRNA<sup>phe</sup> y tRNA<sup>val</sup> de E. coli utilizados presentan al momento de usarse un % de aminoacilación del orden de 42 y 35 respectivamente, utilizando como fuente de enzima un sobrenadante de 105.000 x g de E. coli.

(—○—○—) (—□—□—) nivel de metilación alcanzado en tRNA<sup>phe</sup> y tRNA<sup>val</sup> respectivamente en presencia de espermina.

(—●—●—) (—■—■—) nivel de metilación alcanzado en tRNA<sup>phe</sup> y tRNA<sup>val</sup> respectivamente en ausencia de espermina.

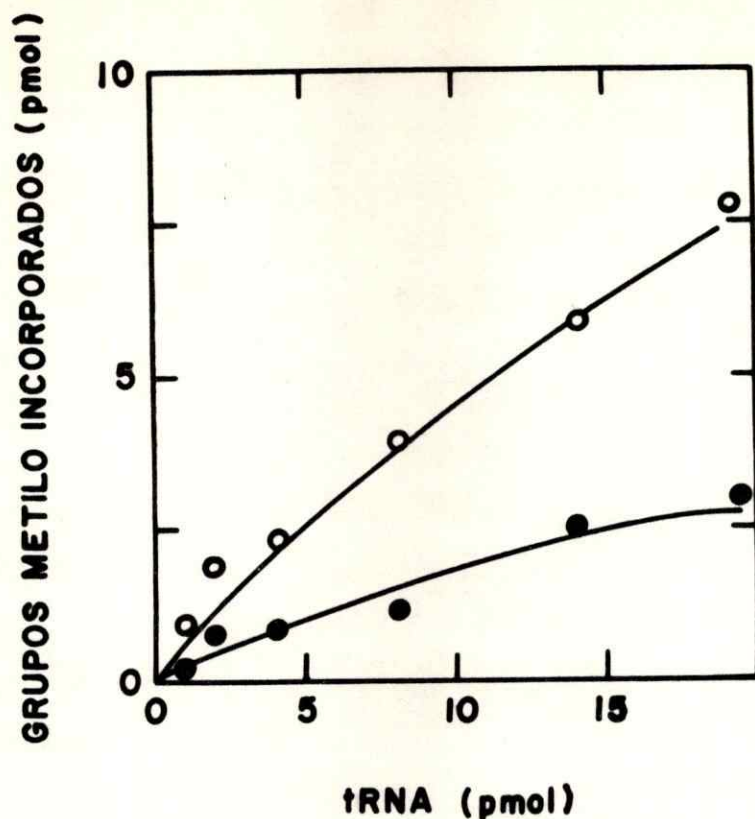


Figura 10. Capacidad aceptora de grupos metilo del tRNA total de E. coli catalizada por la tRNA metil transferasa I de ovario de X. laevis.

La incubación se realiza igual que la determinación de actividad enzimática descrita en Métodos, excepto que el tRNA usa en cantidades limitantes como se muestra en la figura. La cantidad de tRNA metil transferasa I utilizada es de 12  $\mu\text{g}$  y se determina el tRNA metilado según se especifica en Métodos. Cuando se utiliza espermina se usa en una relación entre 10 a 150 moles de espermina/mol de tRNA.

- (—○—○—) nivel de metilación alcanzado en presencia de espermina.
- (—●—●—) nivel de metilación alcanzado en ausencia de espermina.



Como una manera de precisar más aun sobre la distinta identidad de las actividades metilantes de tRNA, se realiza una determinación de peso molecular de ambas fracciones. Para ello se efectúa una filtración en una columna de Sephadex G-200 de una mezcla de fracciones I y II de las tRNA metil transferasas parcialmente purificadas por DEAE-celulosa. La razón para proponer esta determinación de pesos moleculares con una mezcla de fracción I y II de enzima, es solamente para aprovechar de obtener la información de ambas enzimas simultaneamente. Dado que las fracciones I y II de enzima presentan un comportamiento distinto frente a la espermina, es fácil diferenciar ambas actividades. Es posible determinar con este doble ensayo en presencia y ausencia de espermina, que las fracciones I y II tienen pesos moleculares de 190.000 y 125.000 respectivamente como se ilustra en la Figura 11. El mismo resultado se obtiene cuando se filtra separadamente en Sephadex una fracción aislada de la tRNA metil transferasa I (Figura 12).

## 2. DISTRIBUCION SUBCELULAR DE LA tRNA NUCLEOTIDIL TRANSFERASA Y DE LAS tRNA METIL TRANSFERASAS EN OOCITOS DE X.LAEVIS.

En este capítulo hemos estudiado la distribución en el núcleo y citoplasma de las enzimas tRNA metil transferasas y tRNA nucleotidil transferasa.

Para realizar estos experimentos se obtiene núcleos y oocitos anucleados, por disección manual de folículos en su máximo estado de desarrollo como se describe en Métodos. El extracto citoplasmático proviene de una homogeneización de oocitos anucleados. Como control de estos experimentos se utilizan también extractos de oocitos enteros.



FIGURA 11

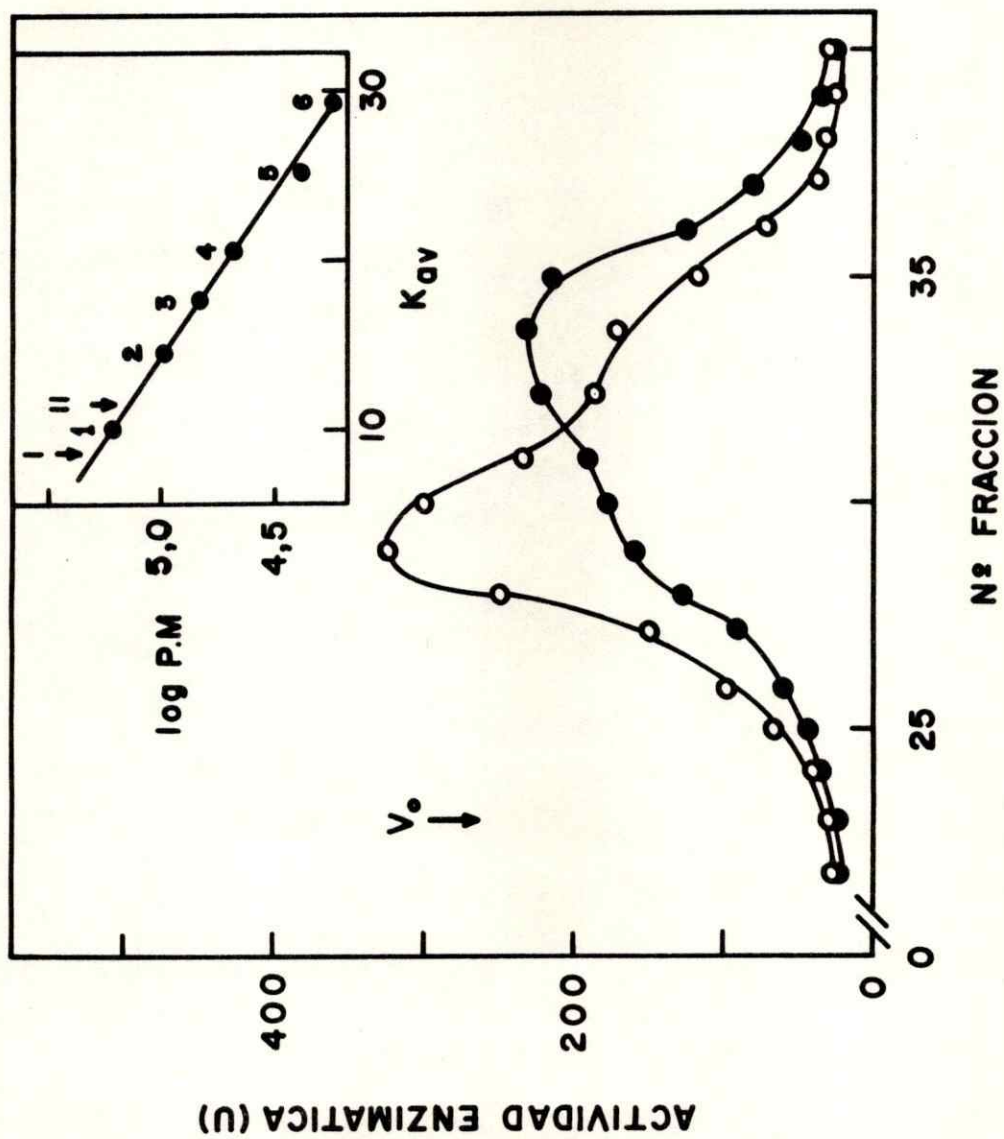


Figura 11. Determinación de peso molecular de la tRNA metil transferasa I y II de ovario de X.laevis

Se filtra en una columna de Sephadex G-200, 2,1 mg de una preparación que contiene las tRNA metil transferasas I y II de ovario parcialmente purificadas en DEAE-celulosa, según las condiciones descritas en Métodos.

La muestra se filtra a través de la columna con un flujo de 9 ml/hr, se recogen fracciones de 2,5 ml y se determina actividad enzimática alícuotas de 0,1 ml en un volumen final de 0,15 ml según las condiciones descritas en Métodos.

En el recuadro se muestra la calibración de la columna de Sephadex G-200 con las siguientes proteínas marcadoras como referencia: 1.  $\gamma$ -globulina humana (160.000), 2. fosforilasa b (94.000), 3. sero albúmina de bovino (67.000), 4. ovoalbúmina (45.000), 5. quimotripsinógeno A (23.000) y 6. citocromo c (12.500).

Las flechas indican el volumen de elución de las tRNA metil transferasas I y II de ovario.

(—○—○—) Actividad enzimática en presencia de espermina 0,4 mM.

(—●—●—) Actividad enzimática en ausencia de espermina.

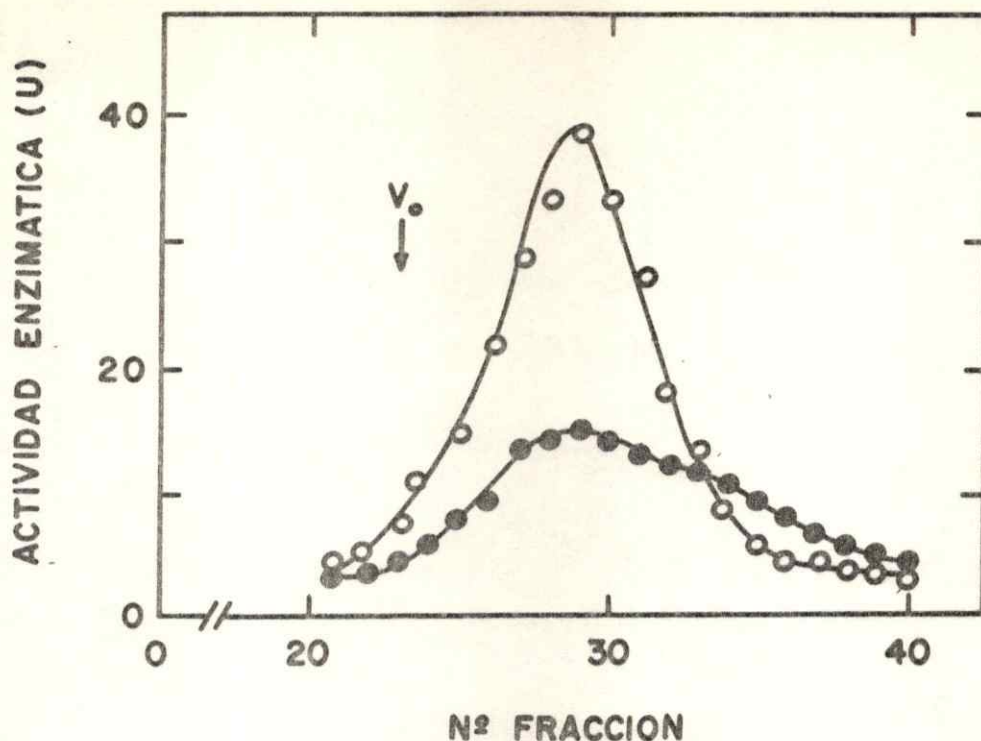


Figura 12. Determinación de peso molecular de la tRNA metil transferasa I de ovario de X. laevis.

Se filtró en una columna de Sephadex G-200 1,3 mg de una preparación de tRNA metil transferasa I parcialmente purificada por DEAE-celulosa como se describe en Métodos. La columna de Sephadex G-200 (65 x 1,5 cm) se equilibra en una solución que tiene: Tris-HCl 20 mM pH 8,0, KCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, β-mercaptoetanol 2 mM y EDTA 0,5 mM. La muestra se filtra por la columna con un flujo de 9 ml/hr, se recogen fracciones de 2,5 ml y se determina actividad enzimática a una alícuota de 0,1 ml en un volumen final de 0,15 ml según las condiciones descritas en Métodos.

- (—○—○—) actividad enzimática en presencia de espermina 0,4 mM.
- (—●—●—) actividad enzimática en ausencia de espermina.



## 2.1. Distribución subcelular de la tRNA nucleotidil transferasa.

Al estudiar la distribución subcelular de la tRNA nucleotidil transferasa en los extractos citoplasmáticos, nuclear y total de oocitos, se observa que existe más de un 50% de la actividad enzimática en el núcleo de los oocitos y el resto estaría en el citoplasma (Figura 13). La actividad enzimática recuperada entre núcleo y citoplasma no es totalmente aditiva respecto al oocito intacto, debido a que durante el proceso de extracción del núcleo se produce una pérdida de material citoplasmático estimada en un 20 a 30% del total. Sin embargo, si consideramos esta merma podemos llegar a obtener un nivel de tRNA nucleotidil transferasa igual al encontrado en oocitos enteros, lo cual indica que mediante el método empleado para obtener núcleos no hay una pérdida sustancial de ésta enzima durante el proceso de lavado, como ocurre en otros sistemas (66).

Se puede observar asimismo que al medir la actividad enzimática de la tRNA nucleotidil transferasa en los extractos provenientes de oocitos intactos y de oocitos anucleados se tiende a un plateau de la actividad al usar grandes cantidades de extracto celular. No ocurre lo mismo al medir actividad enzimática en extractos de núcleos aislados, lo que podría deberse a que ésta enzima de núcleos está mucho más pura que la de los oocitos enteros o los anucleados, en los cuales podrían existir componentes inhibitorios de la reacción. Se ha determinado que

FIGURA 13

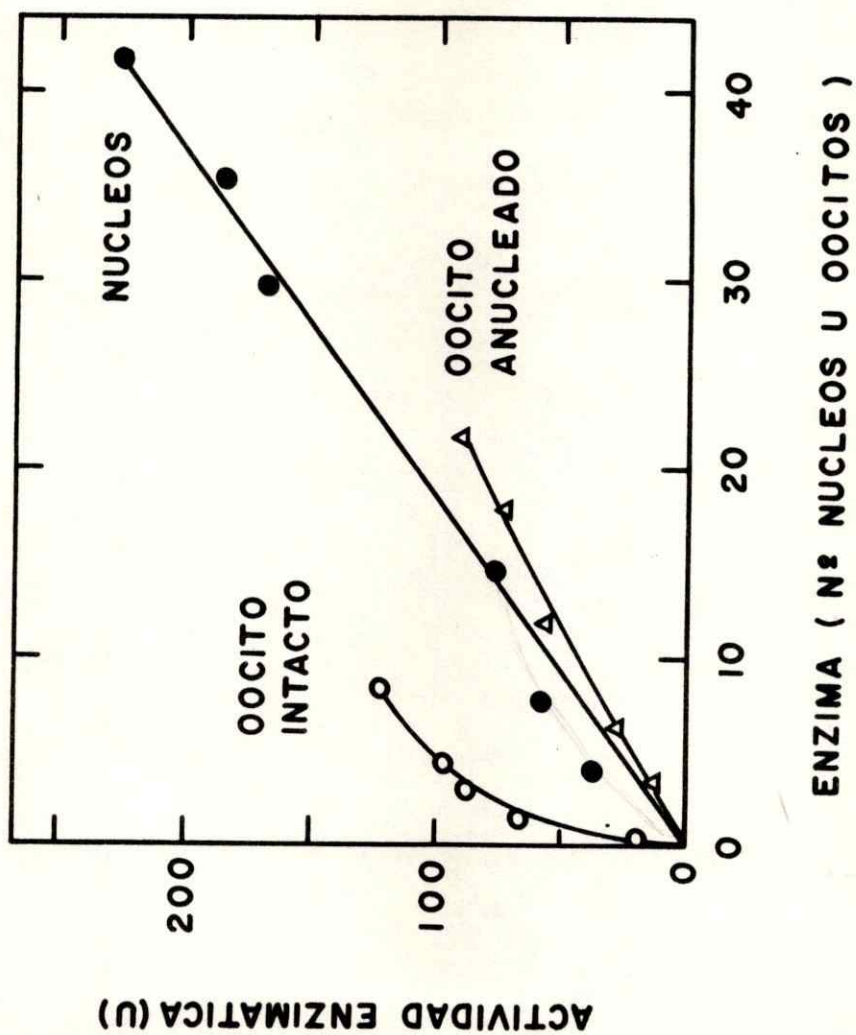


Figura 13. Distribución subcelular de tRNA nucleotidil transferasa en oocitos de X. laevis.

Se cuantifica la cantidad de enzima existente en oocitos intactos, oocitos anucleados y núcleos, utilizando como fuente de enzima un sobrenadante proveniente de una centrifugación de 20.000 x g según las condiciones descritas en Métodos. La cantidad de enzima se expresa como equivalente a número de células u organelos medidos antes de la homogeneización.



el contenido de proteínas solubles en el oocito total y en el núcleo es del orden de 30  $\mu$ gr y 4  $\mu$ gr respectivamente (67) (68).

## 2.2. Caracterización de la tRNA nucleotidil transferasa proveniente de núcleos y citoplasma.

Para determinar si las actividades de las tRNA nucleotidil transferasas nuclear y citoplasmática corresponden a una misma forma de enzima o a entidades diferentes se estudia el pH óptimo y el comportamiento cromatográfico en DEAE-celulosa de ambas fracciones enzimáticas.

En la Figura 14 se observa que ambas fracciones enzimáticas poseen un pH óptimo muy similar y cercano a 9,0, el cual concuerda con el pH óptimo descrito para la tRNA nucleotidil transferasa de otros sistemas (69).

El estudio del comportamiento cromatográfico en DEAE-celulosa de estas dos fracciones de la tRNA nucleotidil transferasa *indica* que tanto la enzima proveniente de citoplasma como la nuclear y la fracción proveniente de oocito total eluyen con la misma fuerza iónica (Figura 15).

Estos limitados estudios de caracterización no nos han permitido encontrar diferencias entre las actividades presentes en el núcleo y citoplasma.

Resulta interesante destacar que si bien la actividad de la tRNA nucleotidil transferasa se encuentra repartida en ambos compartimentos en cantidades simila-

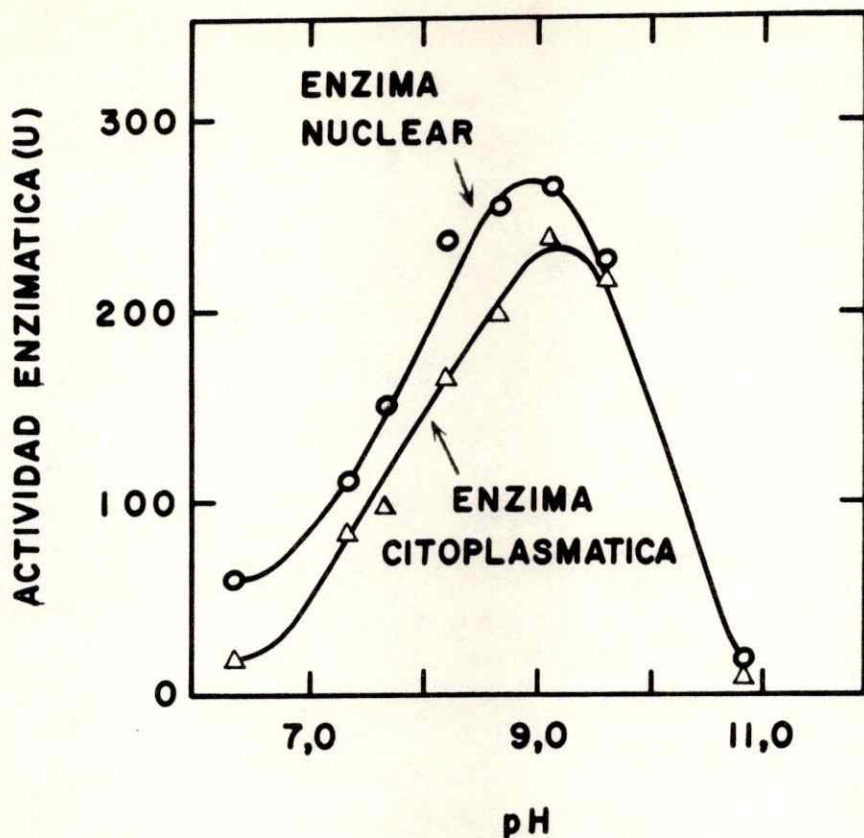


Figura 14. pH óptimo de la actividad tRNA nucleotidil transferasa existente en núcleo y citoplasma de oocitos de X. laevis.

Se ensaya actividad enzimática con tRNA nucleotidil transferasa equivalente a 25 y 18 núcleos y oocitos anucleados respectivamente, las cuales son obtenidas según se explica en Métodos. Las condiciones de incubación son idénticas a las descritas en Métodos, excepto que se utiliza como tampón una solución Tris-glicina 150 m M ajustado a los distintos pH. El pH señalado se mide por microdeterminación de pH en un tubo paralelo.

FIGURA 15

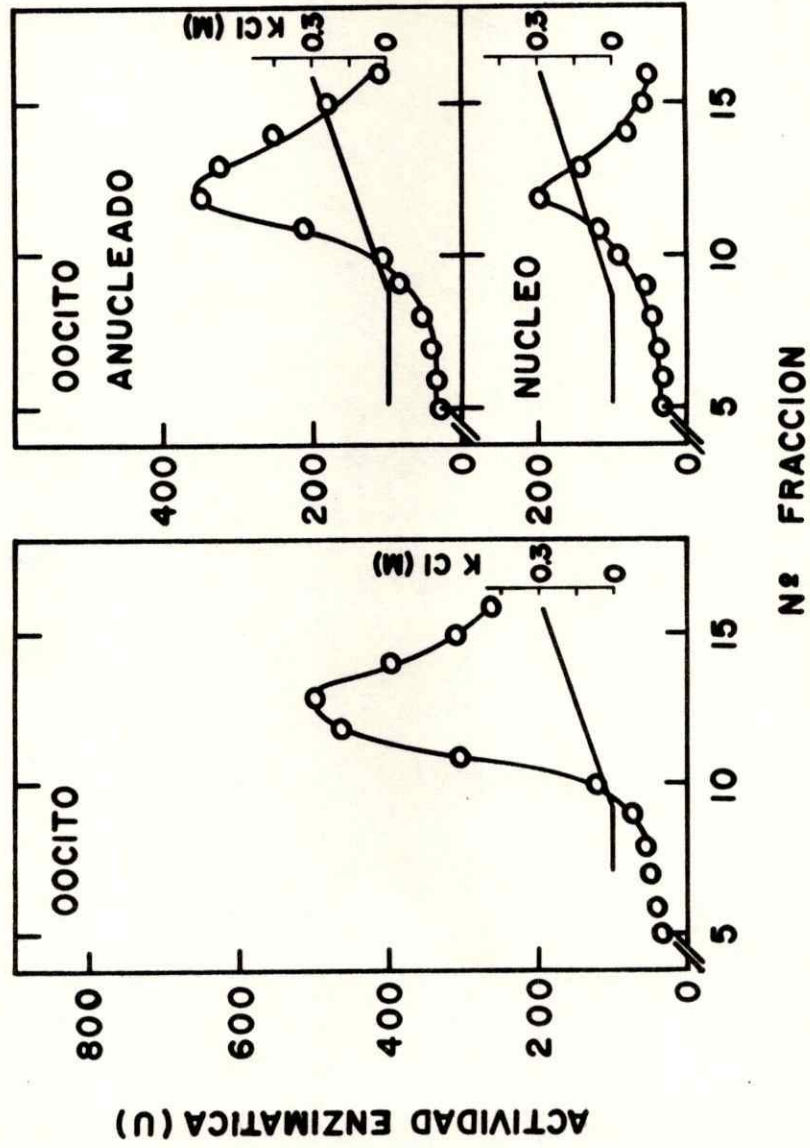




Figura 15. Comportamiento cromatográfico en DEAE-celulosa de la tRNA nucleotidil transferasa de núcleos, oocitos anucleados y oocitos enteros de X. laevis.

Una cantidad de enzima equivalente a 350 células u organelos se homogeneizan en las condiciones descritas en Métodos para ovario. El sobrenadante resultante de una centrifugación a 20.000 x g se dializa y cromatografía en una columna de DEAE-celulosa (2 x 1 cm) equilibrada en las condiciones descritas en Métodos. Se toman fracciones de 0,5 ml y se ensayan alícuotas de 0,1 ml para medir actividad enzimática en un volumen final de 0,15 ml. Una cantidad similar de cada fracción se usa para medir fuerza iónica. La gradiente utilizada para eluir la enzima es entre 0 y 0,4 M de KCl.

res, su concentración sería mucho más alta en el núcleo, ya que éste compartimento representa no más del 5% del volumen total del oocito (66).

### 2.3. Distribución subcelular de las tRNA metil transferasas de oocito.

Al estudiar la distribución subcelular de las tRNA metil transferasas encontramos que existe una cantidad similar de actividad enzimática en el núcleo y en el citoplasma, como se puede observar en la Figura 16. Análogamente a los estudios realizados con la tRNA nucleotidil transferasa, se obtiene una recuperación casi total de la actividad enzimática entre el núcleo y el citoplasma, considerando que al extraer el núcleo se pierde un 20 a 30% de material total.

### 2.4. Caracterización de las tRNA metil transferasas provenientes de núcleos y citoplasma.

Para determinar si existe diferencia en las tRNA metil transferasas nuclear(es) y citoplasmática(s), se realizan estudios del efecto de la concentración de  $Mg^{+2}$  y espermina sobre la actividad enzimática, ya que ambos cationes estimulan una de las fracciones de tRNA metil transferasa de ovario (Figura 5), así como de otros sistemas (70). También se estudia el comportamiento cromatográfico en DEAE-celulosa de las fracciones subcelulares provenientes de citoplasma y núcleo.

FIGURA 16

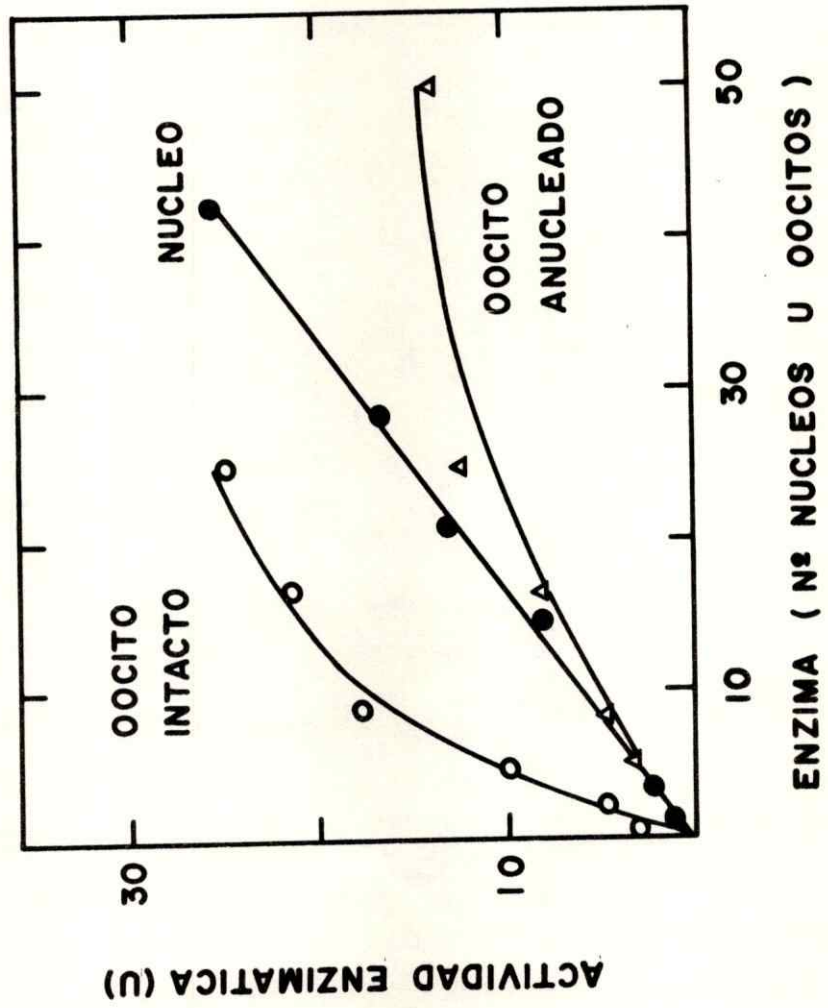




Figura 16. Distribución subcelular de las tRNA metil transferasas en oocitos de X. laevis.

Se cuantifica la cantidad de enzima existente en oocitos intactos, oocitos anucleados y núcleos, utilizando como fuente de enzima un sobrenadante proveniente de una centrifugación del material a 20.000 x g según las condiciones descritas en Métodos en presencia de espermina 0,4 m M. La cantidad de enzima se expresa como equivalente a número de células u organelos medidos antes de la homogeneización.

Al estudiar los extractos de núcleo, encontramos que la actividad del extracto nuclear es estimulado considerablemente por  $Mg^{+2}$  y espermina, como se observa en la Figura 17 obteniéndose un rango óptimo de concentraciones de los cationes de alrededor de 1 mM. Estos estudios se realizaron a una concentración salina de 0,02 M de KCl. En cambio, al ensayar la actividad de la enzima proveniente de citoplasma en presencia de  $Mg^{+2}$  y espermina, encontramos que es parcialmente inhibida por espermina y que la concentración de  $Mg^{+2}$  no tiene efecto en su actividad (Figura 18). Estos resultados preliminares indicarían que aparentemente las tRNA metil transferasas de los compartimentos nuclear y citoplasmático serían distintas y que podría existir una correlación entre las fracciones I y II separadas en DEAE-celulosa a partir de extractos de ovario (Figura 4) y las enzimas detectadas en los extractos nuclear y citoplasmático. Para estudiar esta posibilidad se analiza el comportamiento cromatográfico en DEAE-celulosa de los sobrenadantes provenientes de extractos de núcleo y oocitos anucleados. En la Figura 19 C se muestra que la tRNA metil transferasa I de ovario, presenta el mismo comportamiento cromatográfico que la enzima nuclear, eluyendo ambas de la resina de DEAE-celulosa con una concentración de KCl de 0,1 M; además coincide con el hecho que ambas fracciones son estimuladas por espermina (Figura 5 y 17).

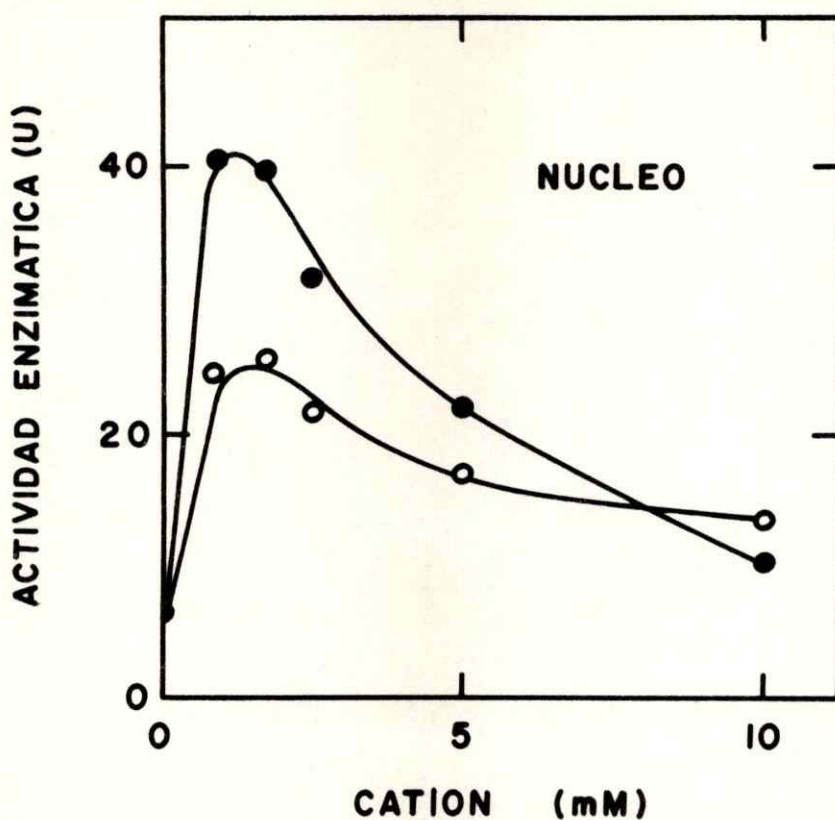


Figura 17. Efecto de  $Mg^{+2}$  y espermina en la actividad de tRNA metil transferasa existente en núcleos de oocitos de X. laevis.

Se utiliza en cada ensayo una cantidad de enzima derivada de un sobrenadante de 20.000 x g proveniente de 32 núcleos. Se incubaba en las condiciones descritas en Métodos para medir actividad enzimática, excepto la presencia de EDTA cuando se estudia el efecto de  $Mg^{+2}$ .

(—●—●—) espermina.  
 (—○—○—)  $MgCl_2$



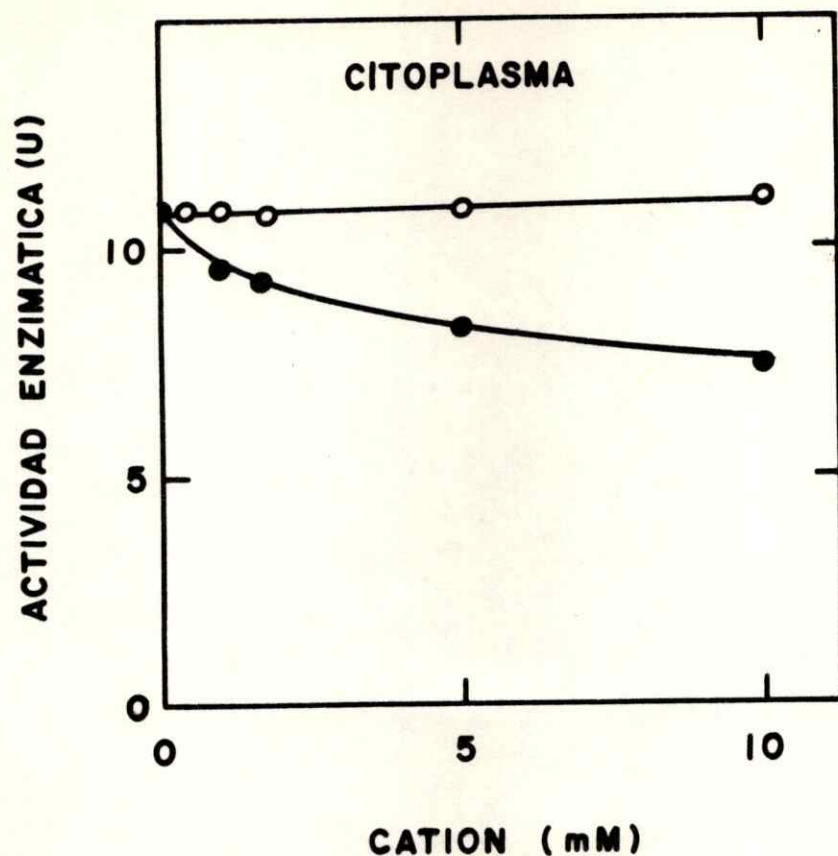


Figura 18. Efecto de  $Mg^{+2}$  y espermina en la actividad de tRNA metil transferasa existente en oocitos anucleados de X. laevis.

Se utiliza en cada ensayo una cantidad de enzima derivada de un sobrenadante de 20.000 x g proveniente de 15 células anucleadas. Se incuba en las condiciones descritas en Métodos para medir actividad enzimática, excepto la presencia de EDTA cuando se estudia el efecto de  $Mg^{+2}$ .

(—●—●—) espermina

(—○—○—)  $MgCl_2$

Al estudiar el comportamiento cromatográfico de la fracción citoplasmática de tRNA metil transferasa, se observa que presenta características similares a la forma enzimática de ovario que eluye de la columna de DEAE-celulosa con concentraciones de KCl de 0,15 M (Figuras 19B); además ambas enzimas presentan un comportamiento similar frente a la espermina, en este caso las enzimas son parcialmente inhibidas por el polication (Figuras 6 y 19 B).

En la Figura 19 A se muestra el perfil cromatográfico de un líquido sobrenadante proveniente de un extracto de oocitos grandes e intactos a modo de control, se observa que el resultado es muy semejante al perfil obtenido desde ovario (Figura 4). Esto indica que los resultados obtenidos con enzima proveniente de ovario son extrapolables a los entregados por oocitos de máxima etapa de crecimiento.

También se desprende de los resultados de las Figuras 19 A y 19 C que la preparación de núcleos es muy homogénea y está desprovista de material citoplasmático. Esta observación está fundada en el hecho que no se detecta en la cromatografía del extracto nuclear la presencia de tRNA metil transferasa con características de la enzima citoplasmática. Por el contrario, en el material citoplasmático se detecta una contaminación parcial por material nuclear, como se aprecia en la Figura 19 B.

FIGURA 9

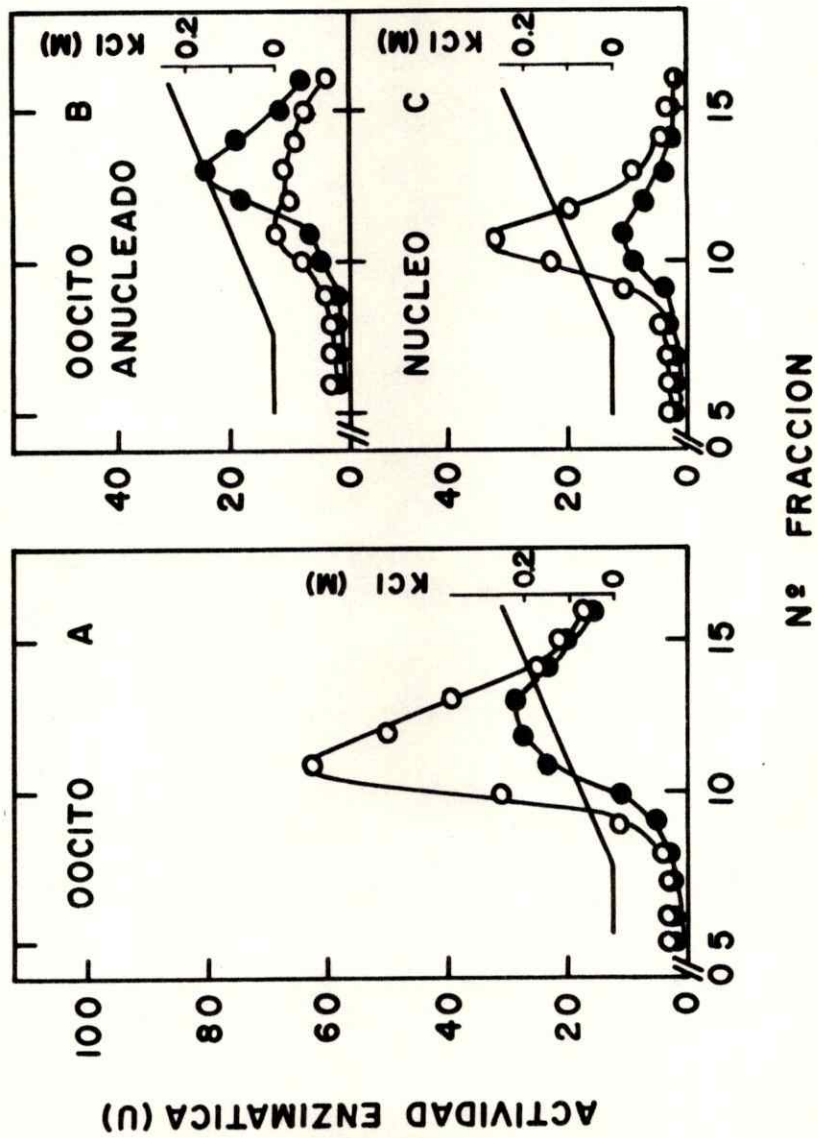




Figura 19. Fraccionamiento en DEAE-celulosa de las tRNA metil transferasas de núcleo, oocito anucleado y oocito entero de X. laevis.

Una cantidad de 420 células u organelos se homogeneizan en las condiciones descritas en Métodos. El sobrenadante resultante de una centrifugación a 20.000  $\times$  g se dializa y cromatografía en una columna de DEAE-celulosa (2 x 1 cm) equilibrada según se describe en los Métodos. Se toman fracciones de 0,5 ml y se ensayan alícuotas de 0,1 ml para medir actividad enzimática en un volumen final de 0,15 ml. Una cantidad similar de cada fracción se usa para medir fuerza iónica. La gradiente salina utilizada para eluir las enzimas es de 0 a 0,3 M de KCl.

- (—○—○—) actividad enzimática en presencia de espermina 0,4 m M.
- (—●—●—) actividad enzimática en ausencia de espermina.

### 3. ESTUDIOS "IN VIVO" DE LA tRNA NUCLEOTIDIL TRANSFERASA.

Con el propósito de estudiar la tRNA nucleotidil transferasa "in vivo", se realiza la microinyección de oocitos con los sustratos utilizados en la medición de la actividad enzimática "in vitro". Después de incubar hasta por 24 horas los folículos inyectados con  $[^3\text{H}]$  CTP o  $[^3\text{H}]$  ATP y tRNA total de levadura hidrolizado en su extremo 3', no se detecta actividad enzimática con este enfoque. Estos resultados sugirieron que probablemente el pool endógeno de ATP y CTP en el oocito diluye al radioactivo, lo cual hace fallido este enfoque para medir la actividad enzimática de tRNA nucleotidil transferasa "in vivo" (61).

#### 3.1. Cinética de reparación de la secuencia CCA "in vivo".

Como una alternativa para superar el problema de medición de la tRNA nucleotidil transferasa "in vivo", se aprovechó la propiedad que tiene el tRNA de ser aminoacilado sólo en condiciones que tenga su secuencia CCA intacta.

Resultados previos del laboratorio donde se hizo esta tesis, habían establecido que el oocito tiene una muy buena actividad fenilalanil tRNA sintetasa medida "in vivo" por microinyección de tRNA en oocitos (71). Estos antecedentes sirvieron para confeccionar un método indirecto de medición de la actividad enzimática por microinyección de un tRNA<sup>phe</sup> al cual se le ha removido químicamente su último nucleótido, y se sigue la capaci-

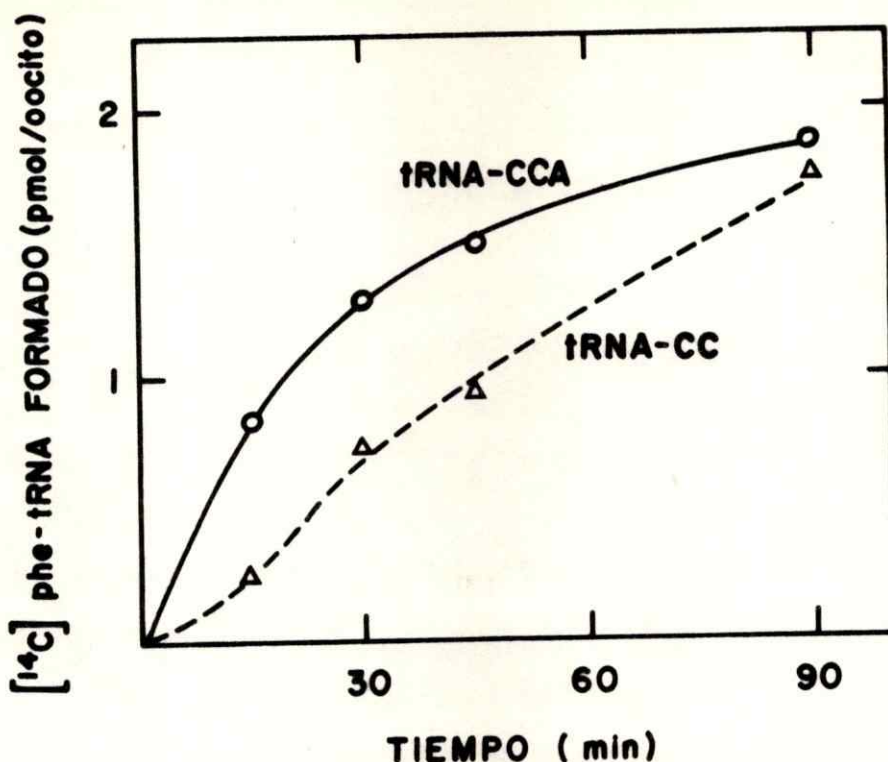


Figura 20. Cinética de aminoacilación "in vivo" de  $\text{tRNA}^{\text{phe}}$  intacto e hidrolizado en su extremo 3'.

Grupos de 5 oocitos preincubados con  $[^{14}\text{C}]$  fenilalanina, se inyectan en duplicado con 2,5 pmoles de  $\text{tRNA}^{\text{phe}}$  medidos por su capacidad aceptora del aminoácido. Después de inyectar los oocitos según se describe en Métodos, se incuban los folículos por el tiempo indicado en  $[^{14}\text{C}]$  fenilalanina a  $21^\circ$ . Se detiene la reacción por homogeneización de las células microinyectadas con fenol y se cuantifica el  $[^{14}\text{C}]$  fenilalanil- $\text{tRNA}^{\text{phe}}$  formado según se describe en Métodos.



dad en este  $\text{trNA}^{\text{phe}}$  de aminoacilarse una vez que dicha molécula sea reparada en su secuencia CCA por la  $\text{trNA}$  nucleotidil transferasa con los nucleótidos trifosfatos del oocito.

La Figura 20 muestra la cinética de aminoacilación de  $\text{trNA}^{\text{phe}}\text{-CC}$  comparado con la reacción del  $\text{trNA}^{\text{phe}}\text{-CCA}$  o control. Se observa también que casi todo el  $\text{trNA}^{\text{phe}}$  deficiente en el extremo 3' logra repararse a los 90 minutos de incubación por una actividad semejante a la  $\text{trNA}$  nucleotidil transferasa. Esta aseveración proviene del hecho que se alcanza un similar nivel de aminoacilación que el  $\text{trNA}$  control o intacto en su secuencia CCA.

Se ilustra también en la Figura 20 que la reacción de aminoacilación del  $\text{trNA}^{\text{phe}}\text{-CC}$  muestra una latencia inicial en la capacidad de aminoacilarse, probablemente debido a los requerimientos previos de reparación de la secuencia CCA por la  $\text{trNA}$  nucleotidil transferasa. Estos resultados indican que en este ensayo indirecto para medir la  $\text{trNA}$  nucleotidil transferasa, la etapa de reparación de la secuencia CCA es más lenta que la etapa de aminoacilación.

### 3.2. Especificidad sustrato de la $\text{trNA}$ nucleotidil transferasa "in vivo".

La Tabla V muestra los resultados obtenidos en dos experimentos separados en que se mide la capacidad de la  $\text{trNA}$  nucleotidil transferasa para reparar  $\text{trNA}^{\text{phe}}$  con diferentes estructuras en su extremo 3'.

TABLA V

Aminoacilación de tRNA<sup>phe</sup> con diferentes extremos 3' inyectados a oocitos de X. laevis

Experimento	Extremo 3' del tRNA inyectado	[ <sup>14</sup> C] fen-tRNA formado (pmol/oocito)
1	tRNA-CCA	1,9
	tRNA-CCA <sub>ox</sub>	0,1
	tRNA-CC <sub>p</sub>	0,4
	tRNA-CC	1,6
2	tRNA-CCA	3,0
	tRNA-CCA <sub>ox</sub>	0,4
	tRNA-CC <sub>p</sub>	0,4
	tRNA-CC	2,5
	tRNA-C	2,7
3	control no inyectado	0,08

Se inyectan oocitos con igual cantidad de las diferentes preparaciones de tRNA en grupos de 5 células en duplicado. El nivel de fenilalanil-tRNA formado se mide después de 90 minutos de incubación según se describe en Métodos. En el experimento 1 y 2 se inyectan 2,5 y 5 pmoles de tRNA respectivamente.

Los resultados indican que el  $\text{tRNA}^{\text{phe}}$  sometido a la remoción del nucleótido AMP 3' terminal, tiene buena capacidad para repararse y por ende a aminoacilarse. Un resultado similar se obtiene con  $\text{tRNA}^{\text{phe}}$  que ha sufrido dos ciclos sucesivos de remoción de nucleótidos en su extremo 3' terminal.

Se observa también en la Tabla V que la eficiencia del tratamiento químico es total, por el hecho que el  $\text{tRNA}^{\text{phe}}\text{-CCA}_{\text{ox}}$  no puede ser aminoacilado. También es interesante destacar que  $\text{tRNA}^{\text{phe}}\text{-CC}_{\text{p}}$  es también inactivo en su capacidad de repararse y por ende a aminoacilarse, lo cual indica que el sistema reparador tiene una especificidad similar a la tRNA nucleotidil transferasa, la cual no puede usar como sustrato a tRNA con fosfato en su extremo 3' (59). Este resultado también indica que en el oocito debe haber una deficiencia de fosfatasa capaz de remover el fosfato 3' terminal.

En conclusión se ha podido establecer que existe una considerable actividad enzimática de tRNA nucleotidil transferasa "in vivo" y que posee la misma especificidad sustrato que otras tRNA nucleotidil transferasas purificadas "in vitro".

Es necesario destacar que en los cálculos de la cantidad de  $^{14}\text{C}$  phe-tRNA<sup>phe</sup> formado, en la Tabla V no se han hecho las correcciones para la supuesta dilución de la fenilalanina radioactiva por el pul endógeno (72). La razón de tal decisión es debido a que los oocitos se



preincubaron por dos horas previo a la microinyección, lo cual según los estudios realizados previamente en el laboratorio permite equilibrar el pul interno con la [ $^{14}\text{C}$ ] fenilalanina exógena (71).

## CAPITULO IV

### DISCUSION

El estudio sobre el procesamiento de tRNA en el sistema de oocitos de X. laevis que se ha presentado en esta tesis, se concentró en dos tipos de reacciones; la metilación de tRNA y la adición de la secuencia CCA al terminal 3' de los tRNA. Los resultados obtenidos nos proporcionan información pertinente a las preguntas específicas que sobre el procesamiento de los tRNA nos planteamos en el capítulo introductorio.

Refiriéndonos a la pregunta sobre la distribución de las enzimas que procesan el tRNA en los compartimentos nuclear y citoplasmático del oocito podemos aportar algunas conclusiones.

Los estudios sobre las tRNA metil transferasas realizados utilizando extractos de núcleos aislados manualmente y fracciones preparadas a partir de oocitos anucleados, han demostrado que las actividades enzimáticas en estos dos compartimentos son diferentes. Esta conclusión se basa en varios criterios; el primero es el criterio cromatográfico que demuestra que actividad proveniente de núcleos eluye como una entidad con una concentración de 0,1 M de KCl en una columna de DEAE-celulosa bajo las condiciones experimentales descritas. Esta fracción cromatográfica coincide con uno de los picos principales observados en

el fraccionamiento cromatográfico de extractos totales de ovario u oocitos, pero difiere de la fracción obtenida de oocitos anucleados que eluye como un pico a 0,15 M de KCl.

Las dos actividades de tRNA metil transferasas fueron diferenciadas también por algunas propiedades físico químicas como el peso molecular aproximado calculado por filtración en gel. Para la enzima nuclear determinamos un peso de 190.000 mientras que la fracción citoplasmática pesa 125.000. Ambas enzimas difieren también en su especificidad hacia los tRNA aceptores de grupos metilo. La enzima nuclear es capaz de introducir en mayor número de grupos metilos en el tRNA de E. coli específico para valina que en el tRNA específico para fenilalanina; lo inverso ocurre con la enzima citoplasmática que muestra preferencia por el tRNA específico para fenilalanina. Esta diferencia indica que estas dos fracciones enzimáticas probablemente están metilando diferentes nucleótidos que se encuentran en los diferentes tRNA específicos que fueron utilizados. Sería una obvia e importante continuación de esta tesis, el determinar la naturaleza de los nucleósidos metilados por ambas enzimas, lo que fundamentaría aún más la diferencia en especificidad ya descrita.

Otro aspecto en que difieren estas tRNA metil transferasas y que tiene especial relevancia por su posible significado fisiológico es el efecto que tienen sobre su actividad el  $Mg^{+2}$  y las poliaminas: la enzima nuclear es activada hasta 8 veces por la espermina y 4 veces por el  $Mg^{+2}$ ,



mientras que la enzima citoplasmática es inhibida por estos compuestos en condiciones similares.

La acción de las poliaminas biológicas sobre ácidos nucleicos y sobre las reacciones que los involucran han concitado reciente interés por parte de los biólogos moleculares. Se ha descrito que la espermina estimula la actividad de tres tipos de enzimas que utiliza a tRNA como sustrato; las aminoacil tRNA sintetasa (73), la tRNA nucleotidil transferasa (65) y las tRNA metil transferasas (63). La evidencia experimental es clara en señalar que la acción de la poliamina estaría a nivel del tRNA. Estudios de difracción de rayos X demuestran que por lo menos dos moléculas de espermina se unen al tRNA por interacción iónica (74). Nuestros resultados también concuerdan con una acción de la espermina a nivel del tRNA, ya que la concentración de este compuesto que da una estimulación óptima, depende de la concentración de tRNA en el medio de reacción. Por otro lado los estudios de cinética realizados con la enzima nuclear en presencia y ausencia de espermina demuestran que esta poliamina no modificaría la  $K_M$  para tRNA, pero sí alteran la  $V_{max}$  de la reacción. Resultados similares se han obtenido en otros sistemas, los que se han interpretado como indicación de efectos sobre el sustrato que no alteran la afinidad de la enzima por el tRNA (65).

Un hecho interesante y relacionado, es que la espermina causa la aparición de nuevos sitios metilables cuan-

do se utiliza tRNA total de E. coli en cantidades limitantes, pero no surte ningún efecto cuando se usa tRNA<sup>val</sup> o tRNA<sup>phe</sup> homogéneos del mismo sistema. Este resultado estaría indicando que el efecto de la espermina sobre la reacción de la tRNA metil transferasa nuclear solo afecta algunas especies de tRNA, cambiando su conformación y aumentando el número de sitios de metilación.

La acción de la espermina sobre esta enzima nuclear es notoriamente dependiente de las condiciones salinas del medio. El  $Mg^{+2}$  reemplaza en parte a la espermina en la estimulación de la metilación y altas concentraciones de KCl también pueden activar la reacción eliminando el efecto de la poliamina.

Se presume que la acción inhibitoria de la espermina sobre la enzima citoplasmática se debe también a la acción de la poliamina sobre el tRNA. En este caso, el efecto sobre la estructura polinucleotídica sería el de esconder los nucleótidos que son metilados por esta enzima. En este caso el efecto de la espermina depende también en gran medida del ambiente iónico de la reacción, sin embargo, el efecto se diferencia notoriamente del producido sobre la enzima nuclear, pues a una fuerza iónica moderada, mientras la enzima citoplasmática es inhibida por el polication, la enzima nuclear es estimulada.

Hay varios argumentos para otorgar un papel fisiológico a la acción de las poliaminas sobre los ácidos nucleicos e indirectamente sobre los mecanismos de expre-



sión genética. La evidencia más sólida en este sentido se ha obtenido con bacterias mutantes deficientes en la síntesis de poliaminas (75). Más relevante a nuestro hallazgo, sin embargo, ha sido un estudio en que se midió la concentración de espermina en el núcleo y citoplasma de fibroblastos, encontrándose que la concentración nuclear (1,3 m M) es más de tres veces superior a la detectada en el citoplasma (0,4 m M) (76). Si la concentración de espermina en el núcleo del oocito fuese similar a la de los organelos de fibroblastos, deberíamos tener una amplia activación de la tRNA metil transferasa nuclear.

Una conclusión interesante del hecho de haber establecido diferencias entre las tRNA metil transferasas del núcleo y del citoplasma es que la distribución de enzimas específicas en los diferentes compartimentos del oocito podría constituir un mecanismo para ordenar en forma secuencial la metilación del tRNA.

En el caso de la tRNA nucleotidil transferasa, el análisis de la actividad de esta enzima en núcleos y citoplasma de oocitos ha sido menos detallado pero los resultados son también de interés. Se ha establecido que ambos compartimentos celulares contienen actividad de esta enzima que agrega la secuencia CCA al terminal 3' de los tRNA. La existencia de esta enzima en el núcleo, con teniendo aproximadamente el 50% de la actividad total es pertinente al hecho de que muchos de los genes de tRNA de eucariotes carecen de la secuencia CCA y esta debe ser a-



dicionada post transcripcionalmente. Como han mencionado De Robertis y Olson inyectando genes de tRNA de levaduras al núcleo de oocitos de X. laevis, ha obtenido evidencia que la adición del terminal 3' ocurriría en el núcleo antes de la etapa en que el tRNA semiprocesado pase al citoplasma. Nuestra evidencia sobre la presencia de la enzima en este compartimento celular refuerza estos datos considerablemente. Como ya se mencionó, la concentración de la enzima en el núcleo sería 10 veces mayor que en el citoplasma celular.

Por otro lado, el hallazgo de la enzima en el citoplasma también es de interés, pues indicaría que esta enzima podría tener, además de la función de procesamiento que ocurriría en el núcleo, una función citoplasmática de reparación del terminal 3' de los tRNA. Los datos de varios laboratorios y los nuestros, presentados en esta tesis, demuestran que el terminal 3' de los tRNA están sufriendo un constante recambio en la célula viva y por ende, existiría la necesidad de un sistema que lo regenera (69). Existe un caudal de evidencia que demuestra que los tRNA maduros son casi absolutamente excluidos del núcleo lo que impediría que la reparación se haga en este compartimento.

A diferencia del caso de las tRNA metil transferasas, no hemos podido detectar diferencias entre las actividades de las tRNA nucleotidil transferasas del núcleo y citoplasma. Los criterios de elución cromatográfica en

DEAE-celulosa, efecto de pH óptimo y peso molecular, no son suficientes para establecer que se trate de la misma enzima distribuida en ambos compartimentos subcelulares. Desgraciadamente en este caso no se pudo disponer del efecto diferencial de la espermina que fue tan útil en el caso de las tRNA metil transferasas. La reacción de la tRNA nucleotidil transferasa requiere  $Mg^{+2}$ , ya que sus sustratos, ATP y CTP interactúan con la enzima complejados a este metal. Este efecto dificulta la detección del efecto de la espermina, pues como se ha visto antes, ésta puede ser reemplazada en gran parte por este metal. En todo caso, hemos logrado demostrar que la espermina también estimula la tRNA nucleotidil transferasa de oocitos.

Un aspecto importante de la tesis, en que se aprovechó la factibilidad de poder microinyectar los oocitos, fue la demostración que un tRNA hidrolizado parcialmente en su terminal 3' podría ser reparado en el citoplasma de oocitos. Inicialmente se evidenció una seria dificultad para medir directamente la reacción de tRNA nucleotidil transferasa "in vivo" por incorporación de ATP o CTP a tRNA total de levadura hidrolizado parcialmente en su terminal 3'. Los resultados negativos al tratar de detectar incorporación de radioactividad al tRNA cuando se coinyecta [ $^3H$ ] ATP o [ $^3H$ ] CTP con el tRNA carente de sus nucleótidos terminales, se pueden explicar posiblemente por la dilución que sufrirían los nucleótidos radioactivos con el "pul" interno de estos compuestos. Woodland y Pestell han medido los "pules" de nucleótidos trifos-



fato en los oocitos detectando que éstos serían de 1 m M para ATP y 0,25 m M para CTP (61). Hemos calculado que esto produciría una dilución de la actividad específica de más de 100 y 350 veces para CTP y ATP respectivamente. Posiblemente este problema podría solucionarse utilizando nucleótidos trifosfato marcados en el fosfato alfa [ $^{32}\text{P}$ ], los que pueden conseguirse con actividades específicas mucho mayores.

Como una alternativa para medir la reparación "in vivo" de la secuencia terminal del tRNA, se utilizó el conocido requerimiento de las aminoacil tRNA sintetasas, de un terminal 3' intacto para poder catalizar la aminoacilación del tRNA. Como ya había sido demostrado en nuestro laboratorio, la aminoacilación "in vivo" de tRNA específico para fenilalanina microinyectado en oocitos puede ser fácilmente detectada (59). En este caso el "pul" interno de fenilalanina es pequeño y el aminoácido radioactivo agregado al medio externo es activamente transportado y concentrado en los oocitos (72). Por lo tanto, preincubando los oocitos 2 horas con [ $^{14}\text{C}$ ] fenilalanina se puede tener a la célula precargada con un aminoácido de alta actividad específica.

Los resultados obtenidos fueron muy claros en demostrar que el oocito tiene una actividad que es capaz de reparar el terminal 3' eficientemente. Los tRNA<sup>phe</sup> carentes de la última Adenosina o de los dos nucleótidos terminales fueron aminoacilados "in vivo" con una eficien



cia casi similar a la obtenida con tRNA<sup>phe</sup> intacto.

A pesar del carácter indirecto del ensayo, se pudo obtener alguna información de interés sobre la actividad de reparación del tRNA inyectado. La cinética de aminoacilación del tRNA incompleto presenta un período de latencia con respecto al tRNA intacto, lo que nos indicaría que la reacción de reparación sería más lenta que la de aminoacilación.

La incapacidad de los oocitos de aminoacilar tRNA cuya ribosa 3' terminal ha sido oxidada con periodato nos indica que las condiciones intracelulares no permiten la  $\beta$ -eliminación del nucleósido terminal que se puede obtener "in vitro" en presencia de aminos primarias. El hecho de que los tRNA que tienen un fosfato en la posición 3' tampoco sean reparados nos indica que la actividad de la enzima responsable de la readición de los nucleótidos terminales en la célula viva, tiene los mismos requerimientos que la tRNA nucleotidil transferasa medida "in vitro" (59). Este hecho es un tanto sorprendente pues demostraría además que el oocito no tiene una fosfatasa capaz de hidrolizar este fosfato 3' terminal.

En general la demostración de una reparación del terminal 3' de tRNA microinyectado es seguramente la prueba más clara de que esta reacción es funcional "in vivo". Al mismo tiempo refuerza la evidencia presentada en esta tesis referente a la presencia de la enzima responsable, la tRNA nucleotidil transferasa, en el citoplasma celular.

Si se sabe, como ya se mencionó, que el núcleo es esencialmente impermeable al tRNA inyectado, entonces la reparación debe hacerse en el citoplasma del folículo (77).

Consideramos que la utilidad de usar oocitos de X. laevis para estudiar el procesamiento post-transcripcional de los tRNA ha quedado demostrado por el trabajo de esta tesis. Hacia el futuro se pueden proponer una serie de otros experimentos que podrían suministrar mucho más información que la ya obtenida. Para lograr estos avances, sin embargo, se ve la necesidad de montar técnicas para analizar en forma rápida y con extrema sensibilidad los diferentes nucleósidos modificados que existen en los tRNA. Otro hecho que facilitaría enormemente estos estudios sería la disponibilidad de verdaderos precursores de tRNA de la misma especie que se pudieran inyectar a oocitos. La manera más prometedora de lograr cantidades importantes de éste material sería la utilización de genes de tRNA de X. laevis que pudiesen ser transcritas "in vivo" e "in vitro" junto con tratamiento con inhibidores de las diferentes etapas de procesamiento.



## BIBLIOGRAFIA

1. Küpper, H., Sekiya, T., Rosenberg, M., Egan, J., Landy, A.  
Nature 272, 423-428 (1978).
2. Altman, S., Smith, J.D. Nature New Biol. 233, 35-39 (1971).
3. Goldfarb, A., Seaman, E., Daniel, V. Nature 273, 562-564  
(1978).
4. Guthrie, C., Seidman, J.G., Comer, M.M., Bock, R.M., Schmidt,  
F.J., Barrell, B.G., Mc Clain, W.H. Brookhaven Symp.  
Biol. 26, 106-123 (1975).
5. Goodman, H.M., Olson, M.V., Hall, B.D. Proc. Nat. Acad.  
Sci. U.S.A. 74, 5453-5457 (1977).
6. Söll, D. Comunicación personal.
7. Abelson, J. Ann. Rev. Biochem. 48, 1035-1069 (1979).
8. Stark, B., Kole, R., Bowman, E.J., Altman, S. Proc. Nat.  
Acad. Sci. U.S.A. 75, 3717-3721 (1978).
9. Garber, R., Altman, S. Symposium on tRNA, Cold  
Spring Harbor Laboratory, N. Y. p. 50 (1978).
10. Smith, J.D., Celis, J.E. Nature New Biol. 243, 66-69  
(1973).
11. Shimura, Y., Sakano, H., Nagawa, F., Eur. J. Biochem.  
86, 267-281 (1978).
12. Robertson, H.D., Altman, S., Smith, J.D. J. Biol. Chem.  
247, 5243-5246 (1972).



13. Hopper, A.K., Bandits, F., Evangelidis, V. Cell 14, 211-220 (1978).
14. O'Farrell, P.Z., Cordell, B., Valenzuela, P., Rutter, W.J., Goodman, H.M. Nature 274, 438-445 (1978).
15. Seidman, J.G., Schmidt, F.J., Foos, K., McClain, W.H. Cell 5, 389-400 (1975).
16. Deutscher, M. Comunicación personal.
17. Cudny, H., Deutscher, M. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. En prensa.
18. Gefter, M.L., Russell, R.L. J. Mol. Biol. 39, 145-157 (1969).
19. Eisenberg, S.P., Soll, L., Yarus, M. Symposium on tRNA, Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y., p. 127 (1978)
20. Roberts, J.W., Carbon, J. Nature 250, 412-414 (1974).
21. Peterkofsky, A., Power, D.M. J. Biol. Chem. 247, 6394-6401 (1972).
22. Ghosh, K., Ghosh, H.P. J. Biol. Chem. 247, 3369-3375 (1972).
23. Okada, N., Shindo-Okada, N., Sato, S., Itoh, Y.H., Oda, K., Nishimura, S. Symposium on tRNA, Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y. p. 3 (1978).
24. Noguchi, S., Yamaizumi, Z., Nishimura, Y., Hirota, Y., Ohgi, T., Goto, T., Nishimura, S. Symposium on tRNA, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. p. 2 (1978).

25. Krauskopf, M., Ofengand, J.      FEBS Letters 15, 111-116  
(1971)
26. Farre, A., Thomas, G.      Symposium on tRNA, Cold  
Spring Harbor Laboratory, N.Y. p. 49 (1973).
27. Simsek, M., Petrissant, G., Rajbhandary, U.L.      Proc. Nat.  
Acad. Sci. U.S.A. 70, 2600-2604 (1973).
28. Lewis, J.A., Ames, B.      J. Mol. Biol. 66, 131-134 (1972).
29. Randerath, E., Chia, L.S.Y., Morris, H.P., Randerath, K.  
Biochim. Biophys. Acta 366, 159-167 (1974).
30. Nau, F.      Biochemie 58, 629-645 (1976).
31. Mandel, L.R., Borek, E.      Biochemistry 2, 560-566 (1963).
32. Björk, G.      J. Virol. 16, 741-747 (1975).
33. Delk, A.S., Romeo, J.M., Nagle, D.P., Rabinowitz, J.C.  
J. Biol. Chem. 251, 7649-7656 (1976).
34. Klagsbrun, M.      J. Biol. Chem. 247, 7443-7451 (1972).
35. Craddock, V.M.      Biochim. Biophys. Acta 195, 351-369  
(1969).
36. Björk, G.R., Nedhardt, F.C.      J. Bacteriol. 124, 99-102  
(1975).
37. Richter, D., Erdmann, V.A., Sprinzl, M.      Proc. Nat. Acad.  
Sci. U.S.A. 71, 3226-3229 (1974).
38. Ny, T., Björk, G.R.      J. Bacteriol. 130, 635-640 (1977).

39. Ny, T., Hjalmarsson, K., Björk, G.R.      Symposium on  
tRNA, Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y. p. 64 (1978).
40. Ofengand, J., Chbádek, S., Robillard, G., Bierbaum, J.  
Biochemistry 13, 5425-5432 (1974).
41. Allende, C.C., Allende, J.E., Firtel, R.      Cell 2, 189-196  
(1974).
42. Schmidt, A., Chernajovsky, Y., Shulman, L., Federman, P.,  
Berissi, H., Revel, M.      Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.  
76, 4788-4792 (1979).
43. Zubay, G., Takanami, M.      Biochem. Biophys. Res. Commun.  
15, 207-211 (1964).
44. Brown, D.D., Littna, E.      J. Mol. Biol. 8, 688-695 (1964).
45. Schmidt, F.      J. Biol. Chem. 250, 8399-8403 (1975).
46. Deutscher, M., Foulds, J., Mc. Clain, W.H.  
J. Biol. Chem. 249, 6696-6698 (1974).
47. Valenzuela, P., Venegas, A., Weinberg, F., Bishop, R.,  
Rutter, W.J.      Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 75, 190-  
194 (1978).
48. Knapp, G., Beckmann, J.S., Johnson, P.F., Fuhrman, S.A.,  
Abelson, J.      Cell 14, 221-236 (1978).
49. Richter, D.      Biochem. Biophys. Res. Commun. 81, 359-363  
(1978).
50. Carré, D.S., Litvak, S., Chapeville, F.      Biochim.  
Biophys. Acta 224, 371-381 (1970).



51. Schaefer, K.P., Altman, S., Söll, D. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 70, 3626-3630 (1973).
52. Seidman, J.G., Mc Clain, W.H. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 72, 1491-1495 (1975).
53. Munns, T.W., Sims, H.F. J. Biol. Chem. 250, 2143, 2149 (1975).
54. Schmidt, O., Mao, J., Silverman, S., Hovemann, B., Söll, D. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 75, 4819-4823 (1978).
55. De Robertis, E.M., Olson, M.V. Nature 278, 137-143 (1979).
56. Kressmann, A., Clarkson, S.G., Pirrotta, V., Birnstiel, M.L. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 75, 1176-1180 (1978).
57. Seidman, J.G., Barrell, B.G., Mc Clain, W.H. J. Mol. Biol. 99, 733-738 (1975).
58. Andrews, P. Biochem. J. 91, 222-233 (1964).
59. Deutscher, M. Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 13, 15-92 (1973).
60. Deutscher, M. J. Biol. Chem. 247, 459-468 (1972).
61. Woodland, H.R., Pestell, Q.W. Biochem. J. 127, 597-605 (1972).
62. Park, L.W., Schlenk, F. J. Biol. Chem. 230, 295-299 (1958).
63. Pegg, A.E. Biochim. Biophys. Acta. 232, 630-642 (1971).

64. Leboy, P.S.            *Biochemistry* 9, 1577-1584 (1970).
65. Evans, J.A., Deutscher, M.        *J. Biol. Chem.* 251, 6646  
6652 (1976).
66. De Duve, C.        *J. Theoret. Biol.* 6, 33-59 (1964).
67. Eppig, J.J., Dumont, J.N.        *Develop. Biol.* 28, 531-536  
(1972).
68. Merriam, R.W., Hill, R.J.        *J. Cell. Biol.* 69, 659-668  
(1976).
69. Daniel, V., Littauer, U.        *J. Biol. Chem.* 238, 2102-  
2109 (1963).
70. Kaye, A.M., Leboy, P.S.        *Biochim. Biophys. Acta* 157,  
289-302 (1968).
71. Gatica, M., Tarragó, A., Allende, C., Allende, J.  
*Nature* 256, 675-678 (1975).
72. Bravo, R., Salazar, I., Allende, J.E.  
*Exp. Cell. Res.* 103, 169-179 (1976).
73. Takeda, Y., Ohnishi, T.        *J. Biol. Chem.* 250, 3878-  
3882 (1975).
74. Quigley, G.J., Teeter, M.M., Rich, A.  
*Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 64-68 (1978).
75. Tabor, C.W., Tabor, H.        *Ann. Rev. Biochem.* 45, 285-  
306 (1976).
76. Cornick, F.M.,                    *Advances in Polyamine Res.*  
Campbell, R. A. ed. p. 173-180 N. York (1978).

77. Gatica, M.      **Comunicación Personal**
78. Schedl, P., Roberts, J.      Primakoff. P. Cell 8,  
531-537 (1976).
79. Hurwitz, J., Gold, M.,      Procedures in Nucleic Acid  
Research.      Cantoni, J., Davied, D. ed. p.362 N.York  
(1967).
80. Brown, D.D., Birkenmeier, E.H., Jordan, E.  
Cell 15, 1077-1086 (1978).