

UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS

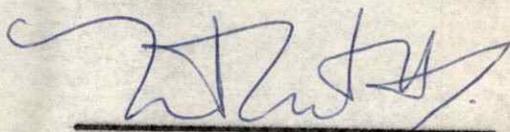
INFORME DE APROBACION  
TESIS DE DOCTORADO

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

CARLOS EDMUNDO SALAS BRAVO

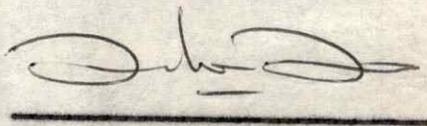
ha sido aprobada por el Comité Informante de Tesis como requisito de Tesis para el Grado de Doctor en Ciencias con Mención en BIOLOGIA en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 21 de Noviembre de 1977.

Dr. Otto Sellinger  
Patrocinante de Tesis



---

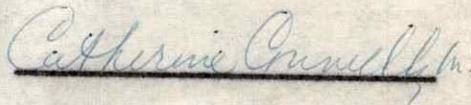
Dr. Tito Ureta  
Presidente Comisión  
Informante de Tesis



---

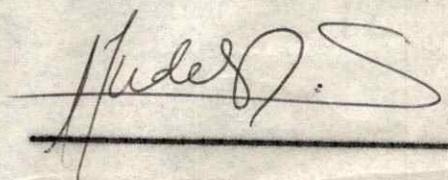
Dr. Carlos Jerez  
Comisión Informante de Tesis

Dra. Catherine Connelly  
Comisión Informante de Tesis



---

Dr. Arturo Yudelevich  
Comisión Informante de Tesis



---

VCH-FC  
DOC. B  
5261  
C.1

## AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer al Dr. Otto Z. Sellinger por su guía a través de este trabajo. Deseo agradecer al Dr. Robert Schatz y todos los miembros del grupo del Dr. Sellinger por su ayuda para llevar a cabo esta disertación.

Finalmente, deseo agradecer la valiosa ayuda prestada por mi esposa Myriam.

## Tabla de contenidos

		Página
Sección 1	Introducción General.....	1
	Materiales .....	41
Sección 2	Metilación homóloga y heteróloga usando metiltransferasas tRNA cerebral. Efecto de la edad y espermidina. Un estudio <u>in vitro</u> .....	43
	Introducción.....	43
	Métodos.....	45
	Resultados.....	46
	Discusión.....	86
	Resumen.....	94
Sección 3	Separación por cromatografía líquida de alta resolución de las bases metiladas en la transferencia de RNA.....	96
	Introducción.....	96
	Métodos.....	99
	Resultados.....	101
	Discusión.....	110
	Resumen.....	112

	Página
Sección 4	
Metilación de tRNA de <u>E. coli</u> por metiltransferasa-Adenina-1 del cerebro de la rata y volúmen de neuronas aisladas.....	113
Introducción.....	113
Métodos.....	116
Resultados.....	121
Discusión.....	137
Resumen.....	143
Sección 5	
Estimulación de metil-transferasas específicas tRNA.....	145
Un estudio <u>in vivo</u>	
Introducción.....	145
Métodos.....	148
Resultados.....	150
Discusión.....	157
Resumen.....	162
Sección 6	
Variaciones de la metilación de tRNA estudiado <u>in vivo</u> .....	163
Introducción.....	163

	Página
Métodos.....	165
Resultados.....	168
Discusión.....	171
Resumen.....	173
Conclusiones.....	174
Referencias.....	178

Lista de Tablas

		Página
Tabla 1	Sitios comunes de metilación del tRNA	
Tabla 2	Cambios con la edad de la distribución relativa de guanina 1-[metil <sup>-14</sup> C] y de guanina. N <sup>2</sup> - [metil <sup>-14</sup> C] en el tRNA metilado homológamente.....	73
Tabla 3	Distribución de los constituyentes metilados de <u>E. coli</u> después de la metilación por enzimas de diferentes orígenes	74
Tabla 4	Efecto de la espermidina en la distribución base [metil <sup>-14</sup> C] del <u>E.coli</u> tRNA metilado por metiltransferasas tRNA del cerebro.....	84
Tabla 5	Separación de las bases metiladas por HPLC en Bondapak/C <sub>18</sub> .....	107
Tabla 6	Purificación del tRNA-AMT de la corteza cerebral completa de la rata.....	129
Tabla 7	Inhibición de tRNA-AMT cerebral.....	134
Tabla 8	Metilación de especies individuales <u>E.coli</u> tRNA.....	135
Tabla 9	Comparación de la capacidad de metilación de tRNA metiltransferasa en la corteza cerebral en neuronas corticales aisladas por tamaño, células gliales y astrocitos cultivados.....	136

Tabla 10	Efectos del MSO, bromido de Etidium y S-adenosil-L-homocisteína en las metiltransferasas tRNA cerebrales.....	151
Tabla 11	Efecto del MSO <u>in vivo</u> en la capacidad de las metiltransferasas tRNA cerebrales para metilar diferentes tRNAs <u>in vitro</u> .....	152
Tabla 12	Efecto del MSO <u>in vivo</u> en las metiltransferasas tRNA cerebrales; cambios en la distribución de bases [metil <sup>-14</sup> ]	

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. La estructura en hoja de trebol del tRNA .....	6
Figura 2. La secuencia nucleotídica de tRNA <sup>phe</sup> de levadura .....	10
Figura 3. La estructura tridimensional del tRNA <sup>phe</sup> de levadura determinada mapas de densidad electrónica con una resolución de Å .....	11
Figura 4. Esquema de las etapas involucradas en la Biosíntesis de tRNA .....	15
Figura 5. El sitio común de metilación del tRNA y el sitio específico .....	25
Figura 6. Metilación enzimática del tRNA de <u>E. coli</u> como una función de la concentración de proteínas .....	57
Figura 7. Efecto de espermidina en la metilación <u>to</u> tal y endógena .....	58
Figura 8. Efecto de la ribonucleasa en la metilación endógena .....	60
Figura 9. Efecto de la pronasa B en la metilación endógena .....	61
Figura 10. Cromatografía MAK de los productos [metil- <sup>14</sup> C] formado por metilación endógena .....	63
Figura 11. Cromatografía MAK de los productos [metil- <sup>14</sup> C] formados por metilación heteróloga	64

Figura 12.	Cromatografía de intercambio iónico de los productos [metil- <sup>14</sup> C] derivados de una metilación homóloga .....	65
Figura 13.	Cromatografía de intercambio iónico de los productos [metil- <sup>14</sup> C] derivados de una metilación heteróloga .....	66
Figura 14.	Cromatografía bidimensional en capa fina de las bases [metil- <sup>14</sup> C] formadas por metilación homóloga .....	69
Figura 15.	Cromatografía bidimensional en capa fina de las bases [metil- <sup>14</sup> C] formadas por metilación heteróloga .....	70
Figura 16.	Cambios en la metilación dependientes de la edad: efecto de espermidina .....	71
Figura 17.	Cinética de incorporación de leucina [3] en aminoacil-tRNA .....	77
Figura 18.	Espectro de absorción de tRNA cerebrales ...	78
Figura 19.	Gradiente de centrifugación en gradiente de leucosa de tRNA cerebrales .....	79
Figura 20.	Efecto de tRNA cerebrales en la metilación endógena .....	80
Figura 21.	Cromatografía en DEAE celulosa de productos [metil- <sup>14</sup> C] formados por metilación endógena .....	82
Figura 22.	Cromatografía en DEAE celulosa de productos [metil- <sup>14</sup> C] formados metilación total...	83
Figura 23.	Efecto de la velocidad de flujo en la separación de 1-metil adenina y 5-metil citosina por $\mu$ Bondapak/C <sub>18</sub> .....	101 a

Figura 24.	Reciclaje de una mezcla que contiene 1-metil adenina y 5-metil citosina .....	101 b
Figura 25.	Separación de una mezcla artificial de 1-metil adenina, 5-metil citosina, 1-metil guanina, 5-metil uracilo y 1-metil hipoxantina por $\mu$ Bondapak/ $C_{18}$ .....	104
Figura 26.	Efecto de fosfato de tetrabutil amonio (0,005 M) en la separación de una mez- cla de bases metiladas que contienen 1-metil adenina, 5-metil citosina, 1- metil guanina, 5-metil uracilo y 1-me- til hipoxantina .....	105
Figura 27.	Separación de una mezcla artificial de 2-metil adenina, 7-metil guanina, $N^2$ -me- til guanina y $N^2$ -dimetil guanina por $\mu$ Bondapak/ $C_{18}$ .....	106
Figura 28.	Separación de una mezcla artificial de citosina, uracilo, guanina y adenina por $\mu$ Bondapak/ $C_{18}$ .....	108
Figura 29.	Separación de una mezcla de bases metila- das por $\mu$ Bondapak/ $C_{18}$ a una velocidad de flujo de aproximadamente 2,0 ml/min y a- proximadamente 2,000 p.s.i. ....	
Figura 30.	Curvas de calibración para bases metila- das .....	
Figura 31.	Análisis de un hidrolizado de tRNA de <u>E.</u> <u>coli</u> por $\mu$ Bondapak/ $C_{18}$ .....	
Figura 32.	Análisis de un hidrolizado de tRNA [metil <sup>-14</sup> C] de <u>E. coli</u> metilado <u>in vitro</u> usando tRNA metil- transferasa de corteza cerebral .....	

Figura 33.	Cromatografía de hidroxilapatita esporoidal de tRNA metiltransferasas de cerebro de rata .....	123
Figura 34.	Cromatografía de hidroxilapatita esporoidal de tRNA metiltransferasas de cerebro de rata .....	124
Figura 35.	Cromatografía en Sephadex G-200 de tRNA de la corteza cerebral total .....	125
Figura 36.	Cromatografía (HPCL) líquida de alta resolución de <u>E. coli</u> tRNA, hidrolizado en $\mu$ Bondapak/C <sub>18</sub> .....	128
Figura 37.	Efecto de NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , Mg <sup>++</sup> y pH en la actividad de tRNA-AMT.....	130
Figura 38.	Efecto de poliaminas en la actividad del tRNA-AMT usando volúmen <u>E. coli</u> tRNA.....	131
Figura 39.	Plano doble recíproco de metilación tRNA usando tRNA-AMT de perikarya .....	132
Figura 40.	Cinética de metilación de <u>E. coli</u> tRNA <sup>phe</sup> usando tRNA metiltransferasas en animales controles y tratados con MSO .....	
Figura 41.	Efecto de espermidina en la metilación de <u>E. coli</u> tRNA .....	153

## Lista de abreviaciones

tRNA, ARNt	Acido ribonucleico de transferencia
mRNA	Acido ribonucleico de transferencia
DNA	Acido desoxiribonucleico
rRNA	Acido ribonucleico ribosomal
A	Adenina
C	Citosina
G	Guanina
U	Uracilo
ATP	Adenosina trifosfato
DEAE Celulosa	Celulosa dietilaminoetilo
EDTA	Acido etilendiamina tetracético
DNase	Desoxiribonucleasa
RNase	Ribonucleasa
PPO	2,5 difeniloxazolona
POPOP	p-bis [ 2- (5-feniloxazolona) ] benzeno
TCA	Acido tricloroacetico
Tris-HCL	Clorhidrato de Tris-[hidroximetil ] amino metano
dpm	desintegración por minuto
cpm	computo por minuto
m <sup>1</sup> A	1-metil-adenina
m <sup>5</sup> C	5-metil-citosina

m <sup>1</sup> G	1-metil guanina
m <sup>5</sup> O	5 metil uracilo
m <sup>1</sup> Hy	1-metil hipoxantina
m <sup>7</sup> G	7 metil guanina
m <sup>2</sup> G	N <sup>2</sup> -metil guanina
m <sup>2</sup> A	2 metil adenina
m <sub>2</sub> <sup>2</sup> G	N <sub>2</sub> <sup>2</sup> dimetil guanina
m <sup>6</sup> A	N <sup>6</sup> -metil adenina
m <sub>6</sub> <sup>6</sup> A	N <sub>6</sub> <sup>6</sup> dimetil adenina
MAK	kieselghur y albumina metilada
MASA	albumina metilada y ácido
MSO	metionina sulfoximina
SAH	S-adenosil-homocistoína
SAM	S-adenosil-metionina
RPC	Fase cromatografía inversa
HPLC	Líquido cromatografía de alta resolución
DTT	ditiotreitol
tRNA-AMT	adenina-1tRNA metiltransferasa

## RESUMEN

En la primera parte de esta tesis hemos estudiado la ARNt metiltransferasas en corteza cerebral de rata durante el período post natal temprano. De esta manera, se ha determinado la existencia de un proceso de metilación homóloga de ARNt al incubar la fracción sobrenadante (3-18 días de edad) obtenida después de una centrifugación a alta velocidad si se agrega S-adenosil-L-[metil-<sup>14</sup>C] metionina en el medio de incubación. La metilación heteróloga fue determinada de una manera análoga pero en presencia de ARNt de E. coli.

Se estudió el efecto de espermidina sobre la metilación homóloga y heteróloga, y, además para conocer la especificidad celular de este efecto, se estudió el proceso de metilación heteróloga en cuerpos neuronales aislados a partir de corteza cerebral de rata.

Posteriormente se describe una técnica rápida y reproducible para la determinación y separación cuantitativa de bases metiladas componentes del ARNt. Dicha técnica no requiere cambios de tampones o controles de temperatura que sean demasiados sofisticados. A continuación se aplica esta técnica al estudio de metilación de ARNt de E. coli.

Más adelante hemos descrito la purificación parcial y caracterización de una de las ARNt metiltransferasas presente en la corteza cerebral de ratas (adenina-1 ARNt-metiltransferasa). Los resultados sugieren que la enzima cerebral comparte las propiedades descritas para otras ARNt-AMT deri

vadas de otros tejidos. Además, la comparación de la actividad enzimática en neuronas y glías demostró valores más altos para ARNt-AMT en células neuronales.

Posteriormente, hemos estudiado el efecto del análogo de metionina, metionina sulfoximína (MSO) en la actividad de ARNt-metiltransferasas.

MSO administrados a ratas de 18 días (post natal) produjo un aumento significativo de la actividad específicas en las ARNt-metiltransferasas de cerebro, determinado in vitro en presencia de ARNt heterólogo.

El análisis cromatográfico del hidrolizado del ARNt mostró un aumento significativo en la formación de [metil-<sup>14</sup>C]-N<sup>2</sup>-metil- y [metil-<sup>14</sup>C]-N<sub>2</sub><sup>2</sup>- dimetil guanina producido por la (s) N<sup>2</sup>-metil y/o N<sub>2</sub><sup>2</sup>-dimetil guanina ARNt metiltransferasa (s) cerebral (es) en los animales tratados con MSO.

Finalmente hemos incluido resultados obtenidos al inyectar intraventricularmente [metil-<sup>3</sup>H] metionina para obtener [metil-<sup>3</sup>H] ARNt in vivo. El [metil-<sup>3</sup>H] ARNt así obtenidos fue hidrolizado para estudiar la distribución de bases metiladas que forman parte del ARNt cerebral.

## INTRODUCCION

De acuerdo al conocimiento actual la síntesis de diversos tipos de RNA se lleva a cabo, en el núcleo celular; luego una gran proporción de estos RNA migra hacia el citoplasma, sitio en que se lleva a cabo la síntesis de proteínas.

Moléculas tales como RNA, proteínas y DNA sufren modificaciones de sus síntesis.

A continuación, se clasificará el tipo de modificaciones que ocurre en diversas macromoléculas a nivel celular:

DNA: Glicosilación, metilación

rRNA: metilación

mRNA: metilación, capping, poliadelinación

pRNA: metilación, tiolación, isopentenilación, reducción

Proteínas: metilación, acetilación, fosforilación

Entre estos procesos modificatorios, la metilación de tRNA ha atraído nuestra atención y será el tema de esta tesis.

Sin embargo, sería interesante presentar un breve resumen del estado del conocimiento actual en relación a estructura de tRNA, su metilación y sus aspectos funcionales de la manera que sea posible la información se referirá al sistema nervioso, pero no nos absterndremos de mencionar aquellos hallazgos obtenidos usando sistemas no neurales cuando se estime conveniente.

La molécula de tRNA se encuentra predominantemente situada en la porción soluble del citoplasma y equivale aproximadamente a un 10-15% del RNA celular total, en tanto, en procariotes como en eucariotes el número exacto de tRNAs no se conoce, pero al menos existe uno para cada aminoácido. En las células

de mamíferos, el número total de moléculas de tRNA por célula puede llegar a ser  $10^8$ . La longitud de la cadena polinucleotídica del tRNA varía entre uno y otro, manteniéndose en un rango de 76 - 85 nucleótidos (1). Teóricamente, las permutaciones posibles de 80 nucleótidos tRNA daría origen a millones de moléculas de tRNA diferentes; sin embargo, en la práctica, solo existen aproximadamente 60 especies en cada célula.

### 1.1 Estructura primaria de tRNA

La estructura primaria de varios tRNA se ha determinado incluyendo algunos de origen mamífero tales como tRNA<sup>ser</sup> de hígado de rata (2). Si tomamos en cuenta el gran número de homologías entre distintos tRNA, podríamos suponer que éstas moléculas tienen su origen en un ancestro común que ha evolucionado manteniendo la estructura secundaria y terciaria esencial para el rol que desempeña en la síntesis proteica (3, 4).

Las técnicas que utilizan  $P^{32}$  han simplificado la separación y el análisis de las secuencias de tRNA y esto explica el presente estado de conocimiento respecto de la secuencia de tRNA de procariotes (5). Además, varios métodos para la marcación in vitro de oligonucleótidos ha ayudado a elucidar secuencias de tRNA (6, 7, 8); de esta manera, se conocen en la actualidad aproximadamente 75 secuencias de tRNAs. Aunque la mayoría de ellos corresponden a tRNA de procariotes,

recientemente se ha establecido la secuencia de tRNAs de Neurospora crassa, germen de trigo, salmón, células de pollo y placenta humana (9); como resultado de ello se ha demostrado que tRNA<sup>ala</sup> y tRNA<sup>met</sup> poseen secuencias idénticas en diversos mamíferos. Esto indica que tal vez ciertas secuencias de tRNA se han conservado durante la evolución. En conformidad con ello, los tRNA iniciadores de hígado de conejo, glándula mamaria de oveja, mieloma de laucha, hígado de salmón y placenta humana, poseen todos ellos la misma secuencia (7, 8, 10, 11).

Otro rasgo común en la molécula de tRNA es la gran cantidad de nucleosidos modificados presentes en cada molécula. Alrededor de 60 nucleosidos modificados se han identificado hasta ahora en el tRNA, de los cuales 40 se conoce su estructura (12). En general, los nucleosidos modificados se forman una vez que se haya completado la síntesis de la cadena polinucleotídica.

La metilación es el tipo más frecuente de modificación en el tRNA y ocurre a nivel del polímero, ya sea en la base o en el residuo glicosídico. La mayoría de las metilaciones ocurre en las bases purínicas y/o perimidínicas; así ocurre en el tRNA de mamíferos en que solo el 10 - 20% de la metilación ocurre en el residuo de la azúcar que el resto (80 - 90%) involucra la base.

Si las células se encuentran en una etapa de rápida división y/o crecimiento rápido a menudo contienen tRNA

hipermetilado. Por ejemplo, la metilación de tRNA aumenta entre 5 y 10 veces en células cancerosas cuando se compara con los controles normales (16). Más aún, en forma general, se ha establecido que mientras más evolucionada sea una especie, más modificado será el tRNA que posee (13, 14).

Además de las bases metiladas, el tRNA posee otras modificaciones: N - [N-(9-β-D-ribofuranosil-purin-6-il)carbomoil] treonina( $t^6A$ ) está presente en *E. coli* levadura y tRNA de mamíferos. Su ubicación junto al anticodon sugiere que puede desempeñar un papel en el reconocimiento de los codones que empiezan con A (15, 16).

$N^6-(\Delta^2$  isopentenil)adenina( $i^6A$ ) se ha detectado en tRNA de hígado de bovino (17), principalmente en la posición junto al terminal 3' del anticodon (12). Aunque su presencia en el tRNA es casi universal (18),  $i^6A$  no es esencial para que el tRNA sea activo en síntesis proteica. Su reemplazo por 1-metilguanina no produce una pérdida en la habilidad que posee el tRNA $^{\phi}$  para dirigir la incorporación de fenilalanina en proteínas usando poly U como mensajero (19). Recientemente, se ha detectado una actividad enzimática en tejido hepático, la cual modifica el tRNA removiendo la cadena isopentenílica que posee el tRNA (20).

Alguna de las adeninas modificadas en el tRNA exhiben actividades similares a las citoquininas, promoviendo la división celular y la diferenciación en plantas (21). La actividad de las citoquininas aparece como restringida a aquellas espe-

cies de tRNA que reconocen codones que empiezan con U (22).

2-tiocitocina y 5-metilamino-metil-2-tiouracilo se encuentran en tRNA de E. coli (23), como asimismo 5,6-dihidrouracilo, 4-tiouracilo y 2-tiouracilo-5-acetato metil ester (24, 25).

La deaminación de residuos en el tRNA produce inosina [tRNA<sup>arg</sup> de E. coli (26), tRNA de levadura en tRNA de hígado de rata (27) ; el cambio de la unión de la ribosa con la base desde la posición 1 a la 5 producirá pseudouracilo (28); la más común de las modificaciones en el tRNA (2, 8 residuos por molécula en tRNA de mamíferos). El origen de pseudouracilo es controversial, ya que algunos argumentan que su formación ocurre en el tRNA como un evento postranscripcional, sin embargo, también hay evidencias que indican que la modificación ocurre durante el crecimiento de la cadena polinucleotídica.

## 1.2 Estructura secundaria del tRNA

Tal vez una de las características más fascinantes que posee el tRNA es su capacidad para ser acomodado en una estructura de trebol con enlaces de H entre las bases de las regiones helicoidales. Esta estructura primeramente propuesta por Holley (29), ha sido posteriormente confirmada en forma reiterada.

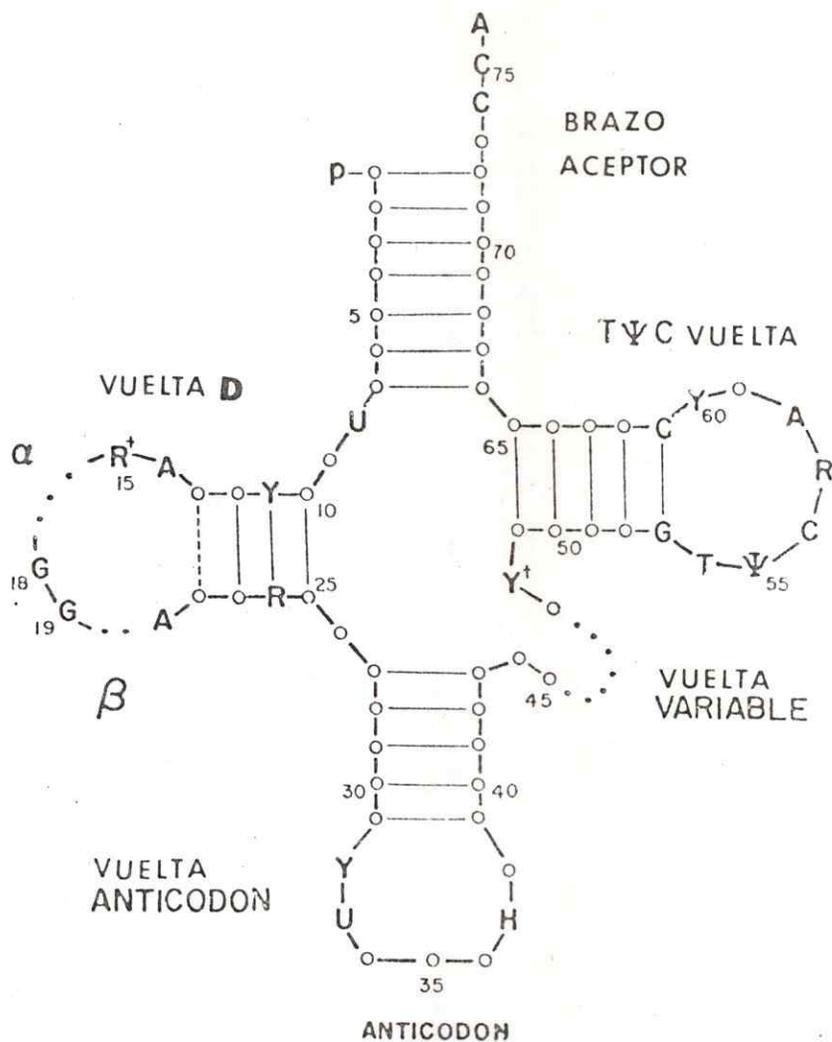


Figura 1. La estructura de trébol del tRNA.

El rasgo esencial de la estructura lo constituye el doblamiento de la cadena polinucleotídica sobre sí misma, formando así regiones de lazos y regiones de doble hélice (brazos).

La Fig. 1 representa un modelo de la estructura de trabajo del tRNA en el cual la molécula contiene tres regiones de lazo más un lazo variable, conteniendo cada uno de estos lazos bases no apareadas.

En general, las bases apareadas en las regiones helicoidales se mantienen juntas por pares de bases de tipo Watson-Crick, pero conteniendo excepcionalmente pares de bases G-U.

Los cuatro lazos son: el lazo dihidrouridina (lazo D, 1°); el lazo anticodon (lazo 2°); el lazo variable (lazo 3°) y el lazo TΨC (lazo 4°).

Los brazos aceptor, anticodon y TΨC poseen un tamaño constante en todos los tRNAs, mientras que el D y el brazo variable cambian en distintos tRNA, explicando así las diferencias en longitud de las distintas secuencias de tRNA. La mayoría de los tRNA se pueden clasificar en cuatro grupos, basándose en el número de bases apareadas en el brazo D y en el número de nucleótidos en el lazo variable (30).

La ubicación en la secuencia de tRNA de algunas de las bases modificadas cuya estructura se conoce hasta este momento, se resumen a continuación:

UBICACION DE LAS BASES MODIFICADAS EN LA MOLECULA  
DE tRNA (31)

- A) Bases menores ubicadas en la primera posición del anticodon  
Uracil-5-oxiacético ácido  
2-tiouracil y sus derivados  
Inosina  
Base Q
- B) Bases menores ubicadas adyacentes al anticodon  
N-6-( -2-isopentenil) adenina y sus derivados  
N- N-(9- -D-ribouranosil)purin-6-il carbamoil treonina y  
sus derivados  
6-metil adenina  
2-metil adenina  
1-metil guanina
- C) Bases menores ubicadas en otras regiones del tRNA  
2-tiocitosina  
4-tiouracilo  
7-metil guanina

La localización de los nucleosidos modificados en regiones específicas del tRNA puede prevenir el apareamiento incorrecto de las bases y de esta manera, estabilizar la estructura tridimensional en la molécula. Sugestivo de ello es el hecho que el tRNA contiene varios residuos invariables y se variables ubicados en la misma posición relativa en todas las moléculas de tRNA. Esto último se muestra en la Fig. 2 en la aquellas bases se representan en la estructura clásica de trebol.

### 1.3. Estructura terciaria del tRNA

La estructura tridimensional del tRNA es de considerable interés, ya que puede entregar la respuesta acerca del modo de acción de la molécula. Las técnicas de difracción de rayos X han mostrado que la molécula tiene la forma de una L con el anticodon en un extremo de la L y el brazo aceptor de aminoácidos en el otro extremo (9).

El mapa tridimensional obtenido con una resolución de  $4\text{\AA}$  (9) demostró que el brazo aceptor y el brazo T C son colineares formando una extremidad de la L mientras que la otra extremidad contiene el brazo D y el brazo del anticodon; sin embargo, estos dos últimos no son totalmente colineares (Fig.3).

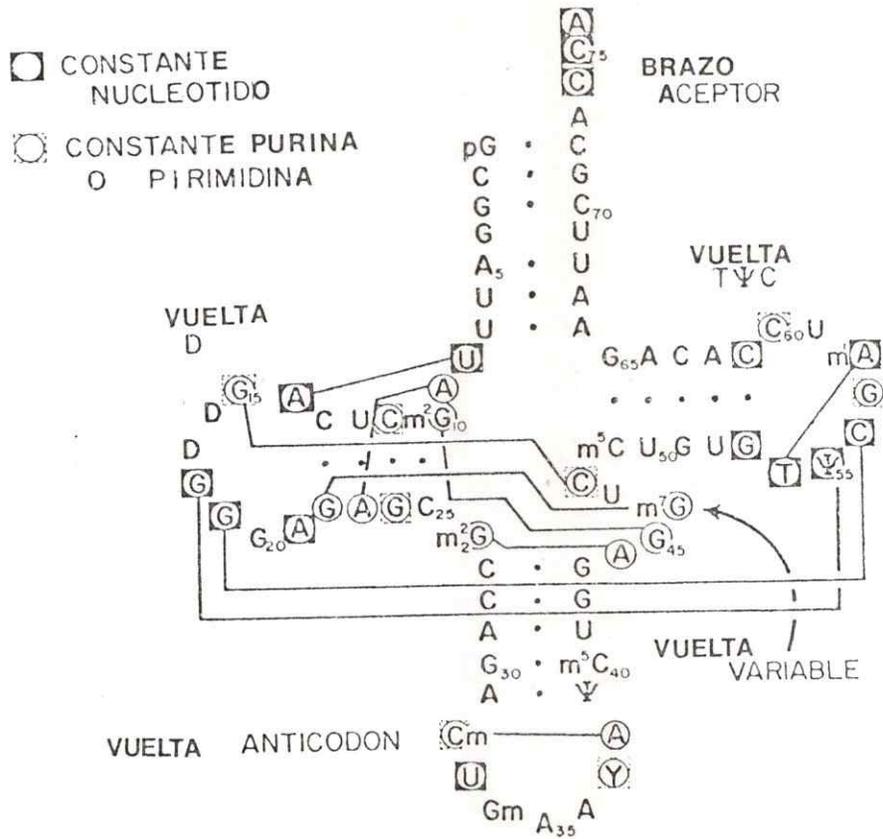


Figura 2. La secuencia nucleotídica del tRNA<sup>phe</sup> de levadura. Se muestran en la figura los nucleotidos constantes como así mismo las purinas y las pirimidinas que existen en la mayoría de las secuencias de tRNA. Las líneas sólidas que conectan los nucleotidos indican las interacciones de tipo terciario de la molécula.

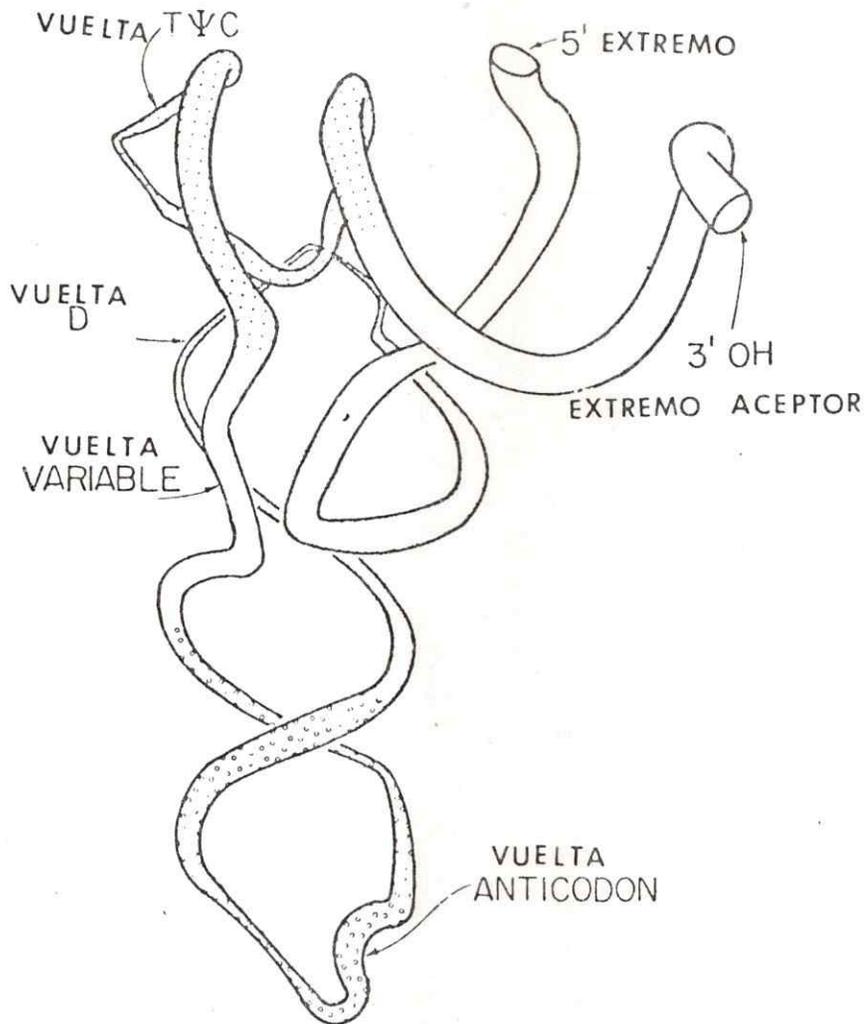


Figura 3. La estructura tridimensional del tRNA<sup>phe</sup> de levadura evidenciada por el mapa de densidad electrónica a 4 Å.

El vértice de la molécula muestra un aumento en el desdoblamiento en aquel lugar en que el lazo D cubre el lazo T' C.

Las posiciones de los residuos 8 y 13 están de acuerdo con los estudios previos de cross-linking del 4-tiouracilo de la posición 8 con las citosina de la posición 13.

Una de las características más interesantes de la estructura terciaria del tRNA<sup>φala</sup> <sup>phe</sup> de levadura (determina con una resolución de 3 Å) lo constituye la gran cantidad de bases constantes, sugiriendo que el tRNA de levadura es un buen modelo para el estudio de la estructura tridimensional de todas las secuencias del tRNA (9).

¿Cuál es significado biológico de la estructura de tRNA determinada en su forma cristalina?. Para responder a ello, debemos mirar a la estructura del tRNA en solución y compararlo con la forma cristalina. Estos estudios incluyen intercambio de agua tritiada, modificaciones químicas, marcación fluorescente y unión de oligonucleotidos a regiones no apareadas, demostrándose un acuerdo con los modelos derivados a partir de difracción de rayos X (32 - 35).

#### 1.4 Síntesis y procesamiento de tRNA

En la búsqueda de mecanismos responsables por la síntesis de tRNA ha sido de vital importancia el hallazgo de secuencias de DNA que codifican la síntesis de tRNA. Así se ha demostrado la existencia de varios genes adyacentes que codifican para tRNAs específicos; es el caso del gene triplete que contiene tRNA<sup>glu</sup><sub>2</sub>, tRNA<sup>treo</sup><sub>3</sub>, y tRNA<sup>tir</sup><sub>2</sub>, transportado por el fago transductor  $\lambda$ h80T (36) y puede expresarse una vez que este fago infecta E. coli. Más adelante, se ha establecido que los genes de tRNA se repiten varias veces en el DNA de organismos superiores. De este modo, mientras en bacterias existen una ó dos copias de tRNA para cada gene, levaduras poseen de 5 a 7 copias, *Drosophila melanogaster* posee 13 y las células de mamíferos aproximadamente 200 (37, 38). Además, las técnicas de hibridación molecular han demostrado considerables divergencias entre tRNAs de distintas especies, como asimismo, que los genes de tRNA se encuentran agrupados en el cromosoma, dejando espacios intermedios denominados genes espaciadores (39).

La Fig. 4 ilustra los pasos involucrados en la biosíntesis de tRNA (40). Las moléculas precursoras de tRNA de mayor longitud que el tRNA maduro que resultan del proceso de transcripción a partir de DNA han sido detectadas en células de mamíferos (39). Asimismo, se ha establecido que en células de eucariotes, éstos tRNAs precursores son rápidamente

transportados desde el núcleo al citoplasma (1).

De el proceso de maduración se conoce muy poco, debido primariamente a la inestabilidad de los precursores de RNA como asimismo, de la enzimas que participan en el procesamiento del precursor. El orden exacto en que estos pasos ocurren tampoco se comprende, pero se estima que la vida media del precursor de tRNA en células hamster varía entre 12 - 15 minutos (41).

De acuerdo a la Fig. 4, los genes de tRNA son transcritos dando origen a precursores de RNA más largos, los cuales después de procesados dan origen a un tRNA maduro. Coetaneo con este procesamiento de los precursores de tRNA, modificaciones selectivas ocurren a nivel de los nucleosidos dando así origen a un tRNA funcional.

La evidencia electroforética ha sugerido que la diferencia en tamaño entre tRNA precursor y el maduro debe ser entre 20 y 30 nucleotidos (42, 43). Los análisis de sedimentación del tRNA precursor de células hamster demostró que posee un coeficiente de sedimentación de 4.8 S mientras que el tRNA maduro posee un coeficiente de sedimentación de 3.8 S (41). Otra peculiaridad del tRNA precursor aislado de células hamster es su grado de hipometilación, si se compara con el tRNA maduro, confirmando así observaciones previas que indican una ausencia de incorporación de  $^{14}\text{C}$ -metil en la región en la región de sedimentación 5S y que solo un nivel de incorporación reducido ocurre en la región del tRNA correspondiente al precursor (41).

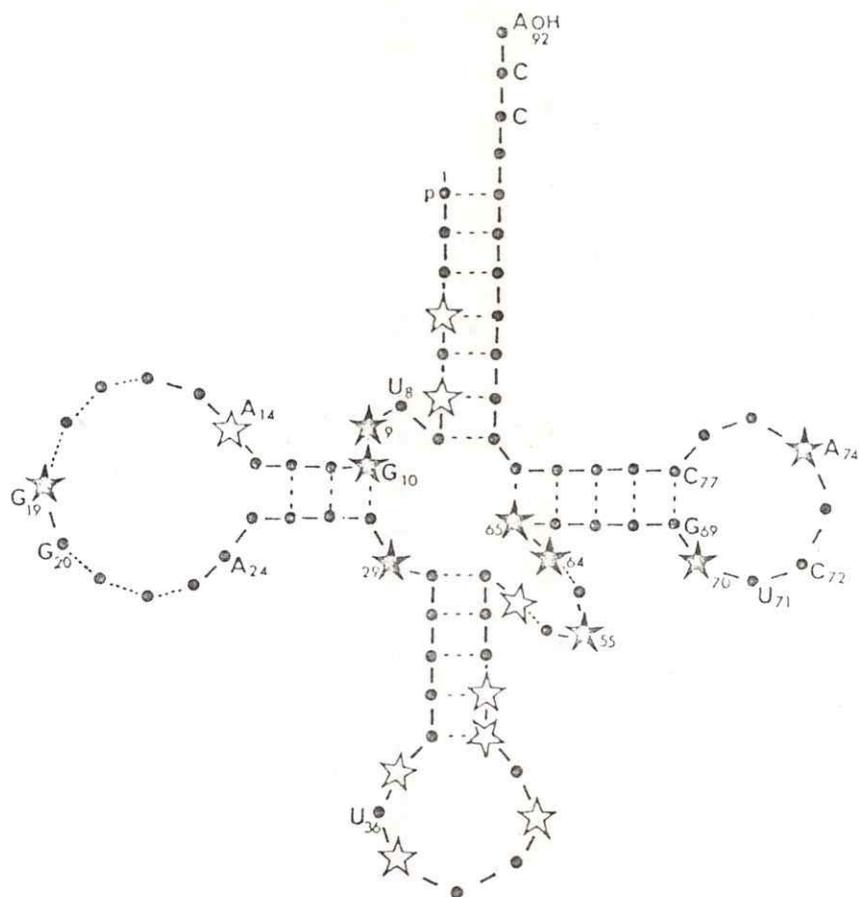


Figura 4. Esquema de los pasos envueltos en la biosíntesis de tRNA (40).

Alguna evidencia electroforética adicional ha sugerido que el tRNA precursor puede procesarse de tal manera que migra junto con el tRNA 4S en geles de poliacrilamida, pero sin estar completamente metilado; este hecho puede ser interpretado como que el substrato principal para las tRNA metiltransferasas es RNA 4S en vez de precursor de tRNA (41).

#### 1.5. Metilación de tRNA

Las modificaciones del tRNA deben afectar su superestructura, afectando así las funciones de estas moléculas. Los grupos metilos son residuos hidrofóbicos con propiedades nucleofílicas cuyos efectos estéricos cambian la distribución electrónica y la capacidad de interacción entre las bases purínicas y pirimidínicas del tRNA.

La metilación de tRNA puede ocurrir por la inserción de 1 ó 2 grupos metilos en el núcleo heterocíclico de cualquiera de las 4 bases principales, o por adición al grupo 2'OH del residuo ribosa como es el caso de la 2'-O metil guanina.

La molécula donadora para esta reacción de metilación es S-adenosil-L-metionina, la cual se sintetiza a partir de L-metionina y ATP; pero al menos se ha encontrado una excepción a esta regla y ocurre en la formación de 5-metil en Bacillus subtilis y Streptococcus faecalis en los cuales la molécula donadora de grupos metilos es metil-tetrahidrofolato (44 - 47).

El estudio de la metilación de tRNA se usan generalmente dos tipos de enfoque: se puede investigar el acto de metilación in vitro aislando y caracterizando las enzimas que juegan un rol en el proceso usando para ello un sustrato heterólogo (E. coli tRNA), o se puede estudiar la distribución de la metilación en las moléculas de tRNA tal como ocurren in vivo si se inyecta metionina radioactiva (48).

Una característica interesante acerca de la metilación, es que un tRNA específico una base puede o no estar metilada, pero que cuando la metilación ocurre, afecta todas las moléculas de tRNA de esa misma especie.

Como lo mencionamos anteriormente, mientras más alto un organismo se encuentra en la escala filogenética, más metilado es el tRNA que posee. Por ejemplo, el tRNA de Micoplasma (el organismo más pequeño libre viviente), contiene menos de un 3% de tRNA metilado, el tRNA de E. coli contiene un 3% de bases metiladas, mientras que en células de eucariotes, 10% de las bases se hayan metiladas (49, 50). Del mismo modo, el tRNA citoplasmático en mamíferos tiene un mayor contenido de bases metiladas que el tRNA bacteriano (49).

Sin embargo, existen excepciones a esta norma, este es el caso de 5-metil uracilo, cuya distribución en cerebro de rata, hígado y músculo es menor que la que existe en sistema bacteriano (49).

Para explicar este fenómeno, Roe y cols. (51) propuso un mecanismo que operaría más efectivamente en células de mamíferos, por medio del cual 5-metil citosina en/o adyacente al lazo menor de ciertos tRNA regularía la cantidad de 5 metil uracilo presente en la molécula de tRNA controlando de esta manera la actividad de la 5-metil-uracilo-tRNA metiltransferasa.

Esta idea sugiere que existen diferencias cuantitativas y cualitativas entre los residuos metilados del tRNA en células procariotes y eucariotes.

Como un ejemplo de ello, tRNA de eucariotes contiene 5 metil citosina y  $N_2^2$  dimetil guanina, las que están ausentes en tRNA de procariotes; pero, que en cambio los sistemas de procariotes poseen 2-metil adenina la cual no ha sido detectada en tRNA citoplasmático de eucariotes (52).

#### 1.6 Las tRNA metiltransferasas

Las enzimas responsables por la metilación de tRNA forman el grupo de las llamadas S-adenosilmetionina-tRNA-metiltransferasas (EC.2.1.1.29-36), generalmente llamadas metiltransferasas.

Su presencia se ha determinado en todos los organismos hasta ahora estudiados, pero no hay clara evidencia si estas enzimas son codificadas por los bacteriófagos después que ellos infectan bacterias (53). Al menos una enzima, la

N<sup>2</sup>-metil guanina-tRNA metiltransferasa ha sido detectada en relación con el virus de avian mieloblastosis (54).

De acuerdo a Klagsbrun (55) y Dubois (56), hay un cierto grado de compartimentalización en las funciones de estas enzimas como se demuestra con las diferencias encontradas en la metilación de tRNAs E. coli y tRNA<sup>asp</sup> de levadura in vitro usando extractos mitocondriales y citoplasmáticos de células Hela y P. vulgaris respectivamente. Los resultados obtenidos por Klagsbrun indican que la adenina-2-metiltransferasa es mitocondrial, mientras que la guanina-2 tRNA-dimetiltransferasa se encuentra en la fracción soluble del citoplasma. Ya que 2-metil adenina se encuentra normalmente en procariotes pero está ausente en los tRNA citoplasmáticos de eucariotes, encontrándose en cambio en mitocondrias, apoya la teoría que la mitocondria ha evolucionado a partir de células de procariotes (55).

Aunque algunos resultados han demostrado la presencia de tRNA metiltransferasas en el núcleo y, particularmente en el nucléolo (57, 58), la mayoría de las enzimas estudiadas se han encontrado en el sobrenadante de alta velocidad (104,000 x g, 1 hr). Se supone por lo tanto, que las tRNA metiltransferasas son enzimas citoplasmáticas, aún cuando al usar solventes no acuosos para su aislamiento (57), la mayoría de la actividad se encuentra en asociación con el núcleo (57).

Recientemente, Agris y cols (59), ha estudiado la distribución sub-celular de las tRNA metiltransferasas encontrándose que la actividad se localiza entre las fracciones microsomal y post-ribosomal.

La purificación de las tRNA metiltransferasa, ha sido difícil debido a su inestabilidad, su baja concentración de entre las proteínas celulares y también porque la detección de su actividad implica un tratamiento laborioso

A pesar de esas dificultades se ha logrado la purificación parcial de alguna tRNA metiltransferasas a partir de diferentes organismos. Es en organismos inferiores donde se ha llevado a cabo la mayoría de los avances, 6 actividades catalíticas diferentes se han reconocido, separado y purificado con éxito (60)

En levadura (61) se han detectado 2 guanina-1-tRNA metiltransferasa, las cuales probablemente metilan residuos en dos posiciones diferente de la molecula del tRNA; un trabajo más reciente describe la purificación (1000 veces) de la 7-metil guanina-tRNA- metiltransferasa a partir de células E. coli. usando para ello cromatografías sefarosa unida a tRNA (62)

Más frecuentemente se ha intentado la separación de estas enzimas a partir de organismos superiores, Chan y Fraser (63) han descrito la purificación (12 veces) de la guanina-N<sub>2</sub><sup>2</sup>- tRNA-dimetiltransferasa a partir de Ehrlich ascites, y más recientemente Glick y colaboradores (64) llevaron a cabo la purificación parcial y la descripción de algunas de las propiedades de la adenina-1-tRNA-metiltransferasa y una guanina-2-tRNA metiltransferasa, derivado de hígado de rata.

Además se ha publicado una revisión extanstiva de los procedimientos para purificación parcial de las tRNA

metiltransferasa (65)

1.6.1. S-adenosil-metionina y tRNA metiltransferasa

Las reacciones en las cuales S-adenosil-L-metionina sirve como donador de grupos metilos han sido extensivamente estudiadas. Se han llevado a cabo sustituciones parciales dentro de la molécula para saber si hay requisitos mínimos que ella debe cumplir en interacción con las metiltransferasas. Aunque solo una de las esteroisómeras del ión sulfanina perteneciente a la S-adenosil-L-metionina es reconocido por la enzima, el átomo de azufre no es esencial en la molécula para su reconocimiento por la enzima, ya que puede ser reemplazado por selenio sin perder la molécula sus propiedades metil donadoras (66). Por otra parte, el grupo amino secundario de la metionina perteneciente a S-adenosil-L-metionina es esencial para su reconocimiento por la enzima (66). La deaminación de adenosina o la decarboxilación de las metianinas en la molécula de S-adenosil-L-metionina, demostraron ser esenciales para la actividad de algunas metiltransferasas (66)

Alternativamente se ha encontrado que animales tratados con L-metionina son capaces de producir S-adenosil-L-metionina y que los grupos etilos pueden ser específicamente

incorporadas en el tRNA. Sin embargo, no es clave hasta el momento si S-adenosil-L-etionina es el intermediario activo en la etilación de tRNA ya que las tRNA metiltransferasas de hígado de rata y bacterianas son incapaces de transferir el residuo etilo desde la S-adenosil-L-etionina a tRNA in vitro (67)

En un trabajo más reciente Pegg (68) demostró que la S-adenosil-L-etionina (0,5- 2,5 mM) procedía un efecto inhibitorio en la metilación de tRNA E. coli in vitro con las enzimas de hígado de rata. Más significativamente aún, se ha demostrado que animales tratados con D,L-etionina poseen una población de tRNAs submetiladas en el hígado, cosa que quedo demostrada por la capacidad que poseen todas TRNA para aceptar grupos metiles in vitro al incubarse con enzimas derivadas de animales normales (69-72).

En términos de la especificidad de la molécula aceptora (tRNA), es sabido que las mononucleosidos, ribonucleosidos sintéticos, DNA y rRNA no actúan como substratos para la tRNA metiltransferasa aunque se sabe que ciertas RNA virales de plantas (Virus del mosaico del tabaco) pueden ser metiladas por tRNA metiltransferasas de E. coli (73). La inhibición de la metilación por análogas de tRNA no se conoce muy bien, sin embargo se ha descrito, que algunas

ribopolinucleotidos, como poli-*inosina* inhiben las tRNA metiltransferasa de Novikoff hepatoma de uha manera no competitiva.. (74).

La inhibición de las tRNA metiltransferasa por medio de la S-adenosil-L-homcisteína y sus análogos, como asimismo los efectos de los iones y poliaminas sobre las enzimas serán discutidas posteriormente.

#### 1.6.2 tRNA metiltransferasas y sus sitios de reconocimiento.

Las tRNA metiltransferasas son enzimas con características única, ellas son bases específicas, especies específicas y órganos específicos. Así, de esta manera, la metilación heteróloga, por medio de una enzima de cierta especie requiere generalmente una tRNA derivado de un organismo menos evolucionado o el tRNA del mismo organismo pero de un órgano diferente.

El reconocimiento entre la enzima y el tRNA parecen involucrar secuencias específicas de nucleotidas y una conformación espacial específica de la molécula de tRNA (75, 76). Pareciera ser que tanto la estructura primaria, secundaria y terciaria de la estructura de tRNA son esenciales

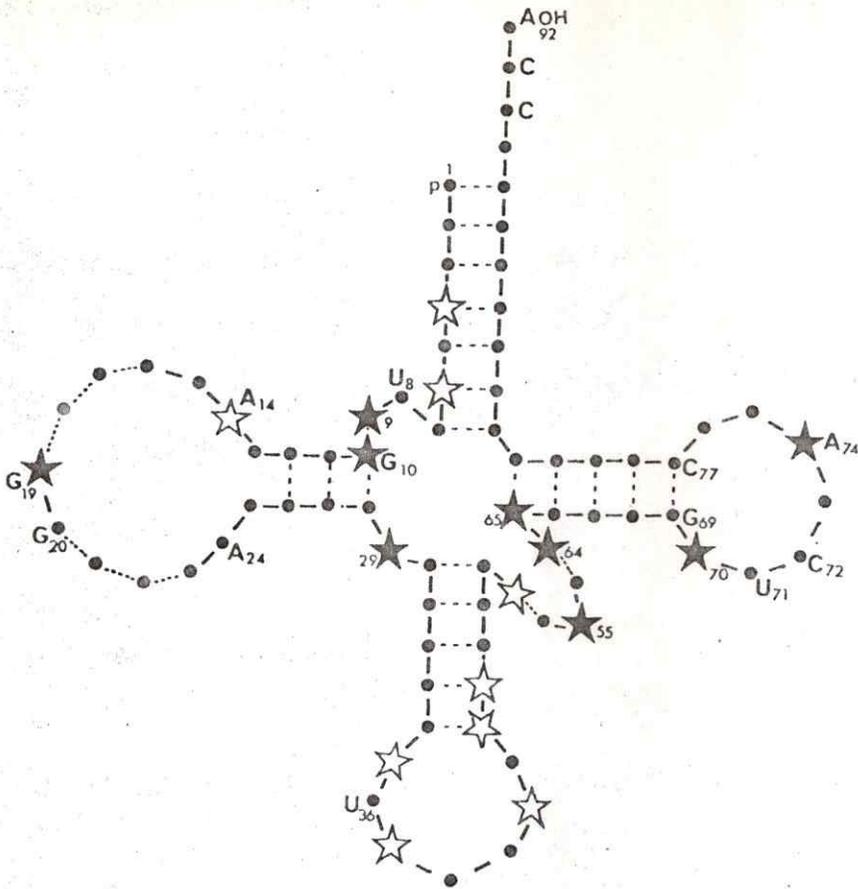


Figura 5. Los sitios de metilación comunes y específicos en el tRNA (78).

Sitios de metilación común

Sitios de metilación específicos

para la metilación ya que cuando fragmentos de tRNA<sup>fmet</sup>, equivalentes en longitud al 75% de la molécula intacta fueron incubados con adenina-1-tRNA metiltransferasa, solo el nivel de metilación ha alcanzado o en el mínimo, en la posición en que habría ocurrido en la molécula de tRNA intacta (77). La adición del fragmento complementario del tRNA devolvió los niveles de metilación normales (77).

Nau (78) comparó una variedad de secuencias de tRNA en busca de analogías en el sitio de metilación (Hay que destacar que para establecer una comparación válida, la secuencia de tRNA deben alinearse compensando las diferencias en tamaño del brazo adicional, la vuelta dihidro-uridina y la vuelta variable). La Fig. 5 muestra las analogías encontradas.

Como resultado de este estudio, se pueden caracterizar dos tipos de sitios de metilación; los sitios de metilación común, que corresponden a posiciones en la estructura de tRNA en que se encuentra la base metilada en muchas tRNA de diferentes especies (Tabla 1)

Los sitios específicos de metilación los cuales pueden estar formados por bases metiladas diferentes o algún otro tipo de modificación en las bases, la mayoría de las cuales se ubican en el lazo anticodon (Fig. 5).

Las tRNA metiltransferasas responsables por las metilaciones en los sitios comunes, posee una especificidad similar o idéntica en la mayoría de los organismos y así parecen constituir un grupo de enzimas las cuales deben haber aparecido tempranamente durante la evolución, algunas de ellas en procariotes y eucariotes.

Las tRNA metiltransferasas responsables por las metilaciones específicas varían marcadamente de un organismo a otro y su sitio de reconocimiento en las secuencias de tRNA ocurre en unos pocos tRNA. Pareciera además que este grupo de enzima ha evolucionado de manera paralela con los tRNA con los cuales actúa.

### 1.7 Isoaceptores en el Cerebro

Existe un gran grado de variedad en la distribución de las tRNA isoaceptores de entre las diferentes especies animales, como asimismo dentro de los tejidos como también dentro de una misma célula (compartimento citoplasmático versus mitocondrial) (79,84).

La cromatografía de columna ha demostrado ser el método de excepción para la separación y caracterización de tRNA isoaceptores.

Así, Melchers y Zachau (85) lograron la separación parcial de 2 tRNA isoaceptores sernina a partir de tejido hepático usando para ello albúmina metilada Kieselghur (MAK), mientras que Stern y Littauer (86) utilizando columna de albúmina metilada de ácido (MASA) separaron con éxito 4 especies isoaceptoras de tRNA fenil alanina.

Otro método para la determinación de especies de tRNA isoaceptoras consiste en la digestión de una población de aminoacil tRNA radioactivos en el amino ácido con RNA asa T<sub>2</sub>, seguido por cromatografía en columnas DEAE celulosa, separandose así las polinucleotidas radioactivas, cuyo número refleja en N° de especies isoaceptoras presentes en la población escogida.

Refinamientos posteriores en la naturaleza del medio sólido soporte para facilitar la separación cromatográfica de la tRNA isoaceptores se llevo a cabo con éxito (88-90).

En mi opinión, sin embargo, de entre los avances logrados la cromatografía de fase reversa (RPC) es la herramienta más práctica para este proposito. RPC fue desarrollada originalmente por Kelmers y colaboradores en los laboratorios Oak Ridgers National (91,91,93), el sistema RPC consiste en un soporte inerte de Kiesel fuhr, recubierto con una base cuaternaria de amonio hidrofóbica, la cual

representa la fase estacionaria y a través de la cual se hace pasar una solución tampón acuoso (fase móvil) con el objeto de desarrollar el cromatograma. Avances posteriores han permitido la creación de RPC -5 en la cual la fase estacionaria consiste de una partícula de 10  $\mu$  de diámetro, consistente en policlorotrifluoroetileno, recubierta con cloruro de triotilfenilamonio (93). El sistema RPC-5 se usa actualmente a nivel preparativo (93) y a nivel analítico (94) Recientemente ha sido utilizado en conjunción con una variedad de otros procedimientos para permitir la preparación de cantidades de tRNA a partir de placenta humana o hígado (95) y cantidades (ing) de especie de tRNA específico de placenta humana (96). La mayoría de estos procedimientos se han utilizado para demostrar la presencia de tRNA isoaceptores en cerebro. Hatfield y Portugal (80) demostraron la presencia de 6 tRNA sernina isoaceptores en cerebro de vacuno usando el sistema de cromatografía RPC, mientras que Frazer y Yang (97), por medio del sistema RPC-2 demostraron la presencia de isoaceptores por medio de arginina, aspartato, histidina, leusina, lisina y serina en cerebros de ratones juvenes y adultos. Más recientemente Murthy y colaboradores (98, 99) han utilizado RPC-5 para caracterizar 2 tRNA glu, 3 tRNA flutamina, 3 tRNA asparli-co y 1 tRNA asparpina en cerebro de ternero.

En forma similar la cromatografía MAK fue utilizada por Kaplan y Colab (100) para determinar la presencia de tRNA isoaceptores en cerebro de pez dorado, en tanto que De Leon, Yang y Sirlin (101) utilizaron el sistema RPC-5 para demostrar una diferencia significativa en los perfiles de los isoaceptores tRNA histidina derivadas de cerebro al compararse con el de otros órganos.

Finalmente, RPC-5 se ha utilizado de manera exitosa para demostrar la presencia de 5 tRNA isoaceptores glicina, 4 arginina, lisina, metionina y valina 3 para alanina y una para prolina en los cerebros de embrión de pollo de 17 días (84).

La distribución intracelular de tRNA isoaceptores ha sido comparada en cerebro de ternero por medio de la RCP-5. Los perfiles de tRNA citoplasmático revelaron la presencia de 5 aceptores tRNA isoaceptores glutánicos mientras que en la fracción mitocondrial se encontraron solamente 3 de ellos. (102)

#### 1.8 FUNCION BIOLOGICA DEL tRNA.

La función biológica conocida más importante del tRNA se lleva a cabo durante el proceso de síntesis protéica; es allí donde el tRNA juega un rol a nivel translacional transmitiendo el mensaje de las cadenas polinucleotídica a la

cadena polipeptídica. Su interacción en el ribosoma con tRNA mensajero y los otros factores que participan en la síntesis protéica hacen posible la síntesis de una cadena polipeptídica. Cierta evidencia que muestra la participación del tRNA en la regulación de síntesis protéica y asimismo en otros procesos celulares ha sido demostrada por cierto tiempo (103).

La etapa inicial en la síntesis protéica es la aminoacidación específica del tRNA llevada a cabo por 20 tRNA aminoacil sintetetasas específica para cada membrana. Estas enzimas utilizan tRNA isoaceptores como sustrato requiriendo también ATP y magnesio para la activación del aminoácido antes de ser transferido al extremo 3' CCA de la molécula. El aminoacil tRNA sintetizado es transportado al ribosoma inhibe al factor EF-Tu en procariotes o al factor EF1 en eucariotes. Durante este proceso el tRNA interactúa con una variedad ribosomales antes de ser relevado del ribosoma una vez que el aminoácido ha sido transferido a la cadena polipeptídica en crecimiento (104).

Además de su bien conocido rol aceptor de aminoácido participante en síntesis protéica, tRNA parece intervenir en la regulación de la síntesis protéica en las células especializadas que producen grandes cantidades de una proteína en particular o alternativamente células que muestran tal tendencia bajo circunstancias especiales durante

su ciclo de vida.

Un ejemplo es el caso del tRNA aceptor de metionina, aislado a partir de dos estados fisiológicos diferentes durante el desarrollo de la glandula de seda posterior en el gusano de seda Mombyx Mosi (105).

En tRNA metionina en cada estado fisiológico fue fraccionado en dos especies isoceptoras; la cantidad determinada por glandulas de una de las especies (especie formidable) aumentó 12 veces durante la diferenciación glandular (105). Ya que metionina no forma parte de la proteína de la seda (fibroína), el aumento de tRNA isoceptor refleja la incrementación de la síntesis general de proteínas durante el estado de un desarrollo examinado.

Se estima que para llevar a cabo la síntesis de fibroína, tRNA debe sintetizarse en grandes cantidades, de manera que las proporciones relativas en las especies de tRNA disponibles coincidan con la frecuencia de cadenas existentes en tRNA inculsafero de fibroína. Respecto a esto se ha demostrado que los niveles de tRNA aminoaciladas con glicina y alamina, los mayores componentes aminoacídico de la proteína fibroína aumentaron 30 veces durante la transición glandular para la producción de fibroína, mientras los niveles de otra tRNA aminoaciladas permanecieron significativamente más bajo (106).

No obstante que la evidencia para el rol regulatorio del tRNA surge de una variedad de sistemas biológicos, la aparición de una hipótesis unificada que sostiene que un tejido determinado las cantidades relativas de cada tRNA libre o acilado están en proporción directa a la composición aminoacídica de las proteínas sintetizadas en este tejido.

Evidencias en favor de esta noción han sido derivadas principalmente de: el análisis de los cambios cualitativos (107) y cuantitativos (108, 109) que ocurren en la distribución de tRNA libres y de sus isoaceptores durante el desarrollo y la diferenciación de tales tejidos especializado b

- b) de estudios en las cuales la síntesis de proteínas especializadas dependió o fue regulada por la cantidad relativa de tRNA aceptores para un aminoácido específico encontrados en proteína predominante en una proteína (110, 111, 112)
- c) Del conocimiento del efecto producido por una modificación particular en la estructura del tRNA en performance en cualquiera de sus etapas en que participa en la síntesis protéica (113, 114, 115).

### 1.8.1 tRNA y su efecto en la síntesis de DNA

La enzima transcriptasa reversa se ha encontrado en algunas variedades de virus que son capaces de sintetizar DNA usando como templado RNA.

Rous sarcoma virus el causante de ciertos tumores similares a sarcoma en pollo, parece utilizar un tRNA celular como "primer" para la síntesis de su DNA en una reacción catalizada por la enzima transcriptasa reversa. Más aún, se ha determinado en la enzima transcriptasa reversa de AVIAN mieloblastosis usa tRNA triptofano, en tanto que el virus de leucemia muriney que usa tRNA<sup>Pro</sup> como producto de partida para la síntesis de tRNA respectivamente (116, 117). Además, una variedad de virus de planta que contiene en el extremo 3' de sus moléculas, similan al tRNA y que puede ser aminoacilado una vez que se incuba con aminoacil-tRNA- sintetasa (118).

Recientes estudios también demuestran que la enzima transcriptasa reversa posee una fuerte afinidad del tRNA y que la inhibición de la transcripción reversa de 60-S-AMV-RNA por medio de AMV transcriptasa reversa ocurre si el tRNA de E. coli se encuentra en la mezcla de incubación (119).

### 1.8.2 Control metabólico de tRNA

En los últimos años varios ejemplos han aparecido que demuestran un control metabólico mediado por el tRNA.

En E. coli una disminución en la velocidad de acilación de metionil tRNA inducida por metionil adenilada que acompañada por una inducción específica de la formación de aminoacil tRNA<sup>met</sup> sintetasa (120, 121). Es así, como los niveles de metionil tRNA regulan la síntesis de novo de la enzima aminoacil tRNA sintetasa.

tRNA desempeña un rol en algunos mecanismos supresivo que tiene lugar en ciertas mutaciones. Tal es el caso en la mutación vermelión, la cual se caracteriza fenotípicamente por la ausencia de un pigmento café en el ojo de la Drosophila Melanogaster. La deficiencia bioquímica se ve reflejada en una disminución de la actividad de la triptofan pirrolasa (122, 123) y la presencia de un tRNA<sup>tyr</sup> isoceptor pareciera correlacionarse con la deficiencia enzimática. La cepa mutante supresora deficiente en esta especie isoceptora, ve restaurada la actividad enzimática ausente en la cepa supresora (122, 123).

En sistemas de procariotes se ha evidenciado la participación de tRNA en supresoras sin sentido dependientes de la temperatura, supresoras erróneas y supresoras externas. En la mayoría de estos casos el gen que codificaba originalmente es

una de las especies de tRNA ha imitado dando origen a una molécula con diferentes propiedades modificantes (124).

Finalmente, se ha acumulado evidencia que indica que en algunos casos los aminoacil-tRNA-sintetasas participan en la represión en la vía biosintética del aminoácido específico que reconocen en la reacción de aminoacilación (125).

Ciertas etapas fisiológicas se caracterizan por cambios en las especies de tRNA, pero sin saber exactamente la naturaleza de los efectos de estos cambios en el metabolismo celular.

Daremos a continuación algunos ejemplos:

- a) En células normales o neoplásticas existen varias especies isoceplasas de tRNA<sup>lys</sup>. Una de ellas, tRNA<sup>lys2</sup> se encuentra en las células en división, pero está ausente en las células en estado proliferativo (109).
- b) Diferentes especies isoceptosas caracterizan los estados de germinación y crecimiento del loufe Neurospora Crassa (126): el citoplasma de la conidia contiene 2 especies de tRNA<sup>phe</sup> (tRNA<sup>phe1</sup> y tRNA<sup>phe2</sup>), mientras que el citoplasma del enicelio tiene solo un tRNA<sup>phe</sup> cuando el conidio se incuba en un medio que permite la germinación y el crecimiento la especie menor desaparece en un plazo de 3 hrs. Se ha sugerido que la desaparición rápida de la especie tRNA<sup>phe2</sup> que se observa in vivo puede ser el resultado de la acción de algu-

na nucleasa.

- c) Varios grupos se han interesado en el estudio de la base Y, un derivado tricíclico imidasol de la guanina. Algunos estados anormales en Nicotiana Tabacum se caracterizan por la presencia de un isoceptor extra  $\text{tRNA}^{\text{phe}}$  (127). Un trabajo preliminar sostiene que una de las especies isoceptoras no posee la base Y, mientras que la otra especie isoceptora al perder la base Y por un tratamiento químico cambia su conducta cromatográfica coincidiendo entonces con la especie que carece de dicha modificación. Asimismo, se ha demostrado la ausencia de base Y en el  $\text{tRNA}^{\text{phe}}$  de hepatoma en contra posición a lo que ocurre en el  $\text{tRNA}^{\text{phe}}$  de hígado natural el cual contiene la modificación (114). Sin embargo, el  $\text{tRNA}^{\text{phe}}$  de hepatoma conserva su habilidad para traducir el polinucleótido poli-U en un sistema que contiene ribosomas y otros factores indispensables para la síntesis proteica, además se ha demostrado que la presencia de la base Y no es un requisito para el reconocimiento específico  $\text{tRNA}^{\text{phe}}$  por la aminoacil

d) La cantidad de  $\Psi 6a$  presente en el tRNA serina cambia en el hígado de sevino desde el estado embriónico al estado adulto. (17, 129).

Aparentemente, en el tejido embriónico solo uno de los 3 isoaceptores serina contiene  $\Psi 6a$ .

e) Recientemente, se demostró que tRNA isoleucina de E. coli el cual se crece bajo concentraciones subóptimas treonina contiene menos del 50% de un nucleosido modificado  $t^6A$  derivado a partir de la trionina, comparado con E. coli que crece bajo condiciones naturales (115). Los dos tipos de tRNA poseen idéntica habilidad para aminoacilarse, paea aceptar el grupo 3' terminal CCA y para formar el complejo tRNA isoleucina-TU-GTP, sin embargo el tRNA deficiente en  $t^6A$ , mostró una menor deficiencia que el tRNA normal en su unión ribosoma.

### 1.8.3 Funciones misceláneas del tRNA

Hay una serie de reacciones en las que no participan los ribosomas y por medio de las cuales aminoacil tRNA sirve como donador de grupos aminoácidos.

Las enzimas que catalizan estas reacciones, aminoacil tRNA proteína transferasas, están vastamente distribuidas en bacterias y mamíferos, ellas catalizan la transferencia del residuo aminoácido desde el tRNA al grupo amino terminal de proteínas determinadas o de ciertos péptidos aceptores (130). Otro grupo de estas enzimas cataliza la formación de aminoacil ésteres de fosfatidil glicerol que ocurre en ciertas bacterias (131).

Un tercer grupo de enzimas (aminoacil-tRNA-N-acetilmuramyl-pentapéptido transferasas) utilizan un aceptor cuya estructura contiene una azúcar sustituida. Estas enzimas catalizan la transferencia del residuo aminoácido desde el tRNA al grupo  $\epsilon$ -amino de la lisina en la cadena peptapéptida que forma parte de la pared bacteriana (132).

En el péptidoglican de la pared celular de Staphilacoccus aureus, el puente formado por los péptidos es pentaglicina, mientras que en el Staphylococcus epidermis los residuos de glicina y serina se han detectado, Para ambos, glicil tRNAs de S. aureus (133) y siril-tRNAs de S. epidermis (134).

varias especies isoceptoras han sido aisladas, todas ellas funcionan en la síntesis del péptidoglican pero en cada caso una de las especies no participa en la síntesis proteica.

La especie de tRNA glicina de S. epidermidis, la cual participa en la síntesis de péptidoglican pero no participa en la síntesis proteica, contiene solo un residuo modificado que no corresponde a un nucleosido metilado (135).

## MATERIALES

La fuente de materiales fue la siguiente: L-[metil-<sup>3</sup>H] metionina (actividad específica 5 Ci/mmol) fue obtenida de Amersham Corp. (Arlington, Hts., IL) S-adenosil-L-[metil-<sup>14</sup>C] metionina (actividad específica 46 mCi/mmol) fue de Research Products International (Elkhart, IN); S-adenosil-L-[metil-<sup>14</sup>C] metionina (actividad específica 57 mCi/mmol), [<sup>3</sup>H] leucina (actividad específica 100 Ci/mmol) de New England Nuclear, (Boston, MA); DEAE-celulosa tipo 52 (microgranular), de Reeve Angel Co. (Clifton, NJ); placas de celulosa con recubrimiento fluorescente indicador N° 6065 de Eastman Kodak Co. (Rochester, NY); ribonucleasa pancreática de Worthington Co. (Freehold, NJ); ácido trifluoroacético, de Matheson, Coleman & Bell (East Rutherford, NJ); (para simplificar y como norma general, los nombres de las ciudades y las iniciales que corresponden a los estados, se mantienen como la versión en inglés, asimismo los paréntesis y los números super o escritos bajo la línea. Lo mismo es válido para las compañías o laboratorios que producen los compuestos. Lo único que se traduce al español es el nombre específico del compuesto). Fosfato monobásico de amonio, DJJ Baker (Phillisburg, NJ); Dowex-50-X8

(200 - 400 mesh) ( $H^+$ ) resina de intercambio iónico de Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA); pronasa grado B de Calbiochem (Los Angeles, CA); L-metionina-dl-sulfiximina de Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO); acrilamida, bis-acrilamida, N, N, N', N',-tetrametilenetilendiamina (TEMED) y amonio persulfato de Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA); hidroxilapatita esferoidal, de Gallard Schlesinger (Carla Place, NJ); S-adenosil-L-homocisteína y sus análogos de Sefochem Fine Chemicals (Jordan Valleys, Israel); espermidia fosfato, de Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO); putrecina dihidrocloruro y espermina tetra-hidrocloruro, de Mann Research Laboratories (New York, NY); Sephadex G-100 de Pharmacia Fine Chemicals (Piscataway, NJ); E. coli tRNA total, de Schwarz-Mann (Orangeburg, NY); E. coli tRNA<sup>val</sup>, de Miles Laboratories (Elkhart, IN); E. coli tRNA<sup>phe</sup>, E. coli tRNA<sup>glu</sup><sub>2</sub> y S-adenosil-L-metionina, de Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN); y tRNA<sup>phe</sup> de hígado de rata de Grand Island Biological Co. (Grand Island, NY).

Las bases no modificadas y modificadas se obtuvieron de las siguientes fuentes: Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO), adenina, citosina, guanina uracilo, N<sup>6</sup>-metil adenina, N<sup>6</sup>-dimetil adenina, 5-metil citosina, pseudo uracilo, 2-metil adenina, N<sup>2</sup>-metil guanina, N<sup>2</sup> - dimetil guanina, 1-metil hipoxantina y 5-metil uracilo; Cyclo Chem (Los Angeles, CA) 1-metil guanina y 7-metil guanina.

## 2 METILACION HOMOLOGA Y HETEROLOGA DE tRNA MEDIANTE LAS METILTRANSFERASAS DE CEREBRO. AFECTO DE LA EDAD Y ESPERMIDINA. ESTUDIO IN VITRO

### 2.1. INTRODUCCION

En los últimos años ha habido un considerable interés por el estudio de las tRNA metiltransferasas provenientes de mamíferos, a causa del supuesto rol que ellas desempeñan en procesos tales como diferenciación celular, infección viral y tumorigénesis (136, 137, 138).

Sin embargo, el estudio de la metilación de tRNA presenta una dificultad inherente al proceso; ya que en condiciones normales, no hay una considerable metilación in vitro al hacer reaccionar tRNA previamente aislado de un organismo con tRNA metiltransferasa proveniente de la misma fuente. Es así como la mayor parte de la información hasta ahora reunida se refiere a estudios de metilación practicados en sistemas heterólogos, vale decir, en los enzimas de una fuente metilan tRNAs de otras fuentes (por ejemplo: enzimas de mamíferos en presencia de tRNA de E. coli o de levadura) (139, 140).

La transferencia de grupos metilos desde S-adenosil-L-metionina a tRNA heterólogas (metilación heteróloga) se ha demostrado que existe en los sobrenadantes obtenidos después de centrifugación a alta velocidad cuando se usa como tejido sistema nervioso; sin embargo, ninguna de las enzimas residuo específica han sido

estudiadas en detalle (141 - 144).

La participación de espermidina, poliamina vastamente distribuida en sistemas vivientes a lo largo de innumerables procesos biológicos, ha sido bien documentada (145 - 147).

Seiler y colaboradores (148 - 149), han demostrado recientemente en sistema nervioso, que los cambios en concentraciones regionales de espermidina durante el desarrollo paralelan los cambios en contenido de RNA. Por otra parte, los efectos de espermidina en la metilación de tRNA (145 - 146) y en la aminoacilación, han sido estudiados (150 - 155) en tejido no neural; sin embargo, hasta la fecha no existe tal información en tejido nervioso.

En presente estudio, hemos comparado los efectos de espermidina en la metilación de tRNA E. coli por medio de las tRNA metiltransferasas provenientes de corteza cerebral de rata durante el desarrollo, asimismo hemos estudiado la metilación de tRNA usando enzimas provenientes de cuerpos celulares neuronales aislados, a partir de corteza cerebral de rata y así poder tener una idea de las diferencias en metilación debidas a especificidad celular (156).

## 2.2 METODOS

### Preparación de tRNA metiltransferasas a partir de corteza cerebral de ratas

Las cortezas cerebrales fueron obtenidas a partir de cerebro de rata Sprague-Dawley machos sacrificadas a las edades especificadas en el texto. Las cortezas fueron homogenizadas en 3,5 volúmenes de buffer cuya composición es la siguiente: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM ditioneitol y 0,1 mM EDTA disódico. Todas las operaciones se llevaron a cabo a 4°C. El homogenizado obtenido fue centrifugado a 165,000 x g durante 4 horas y el sobrenadante recuperado se utilizó como fuente de las enzimas.

### Determinación de la actividad metiltransferasa

Ensayo de velocidad de metilación. El ensayo ha sido descrito con anterioridad (139, 157); la mezcla de incubación contenía en un volumen total 0,15 ml: 15  $\mu$ mol Tris-HCl, pH 8,6; 0,05  $\mu$ mol  $\beta$ -mercaptoetanol, 7 nmol-S-adenosil-L-[metil- $^{14}$ C] metionina, 0,4 nmol E. coli tRNA (cuando es necesario) y 0,02 - 0,3 mg de proteínas. La mezcla se incubó a 37°C, y alícuotas fueron extraídas a distintos intervalos y colocadas

en filtro de disco Whatman N°1 que ha sido previamente embebido en una solución de TCA al 5%. Los discos conteniendo las muestras radioactivas, fueron incubados por 30 minutos en una solución que contenía 250 ml de TCA al 5%, para luego ser lavadas tres veces con 250 ml de TCA de la misma concentración, 2 veces con 250 ml de una mezcla compuesta de etanol-ácido acético - 10 M NaOH (2300 : 120: 1.6 volúmen a volúmen) y finalmente, dos veces con 150 ml de éter etílico. Después de esto, los discos fueron evaporados a sequedad bajo la luz infraroja. La radioactividad en los discos se determinó con una mezcla a base de tolueno en un contador de centelleo Unilux II (Nuclear Chicago).

Ensayo de capacidad de metilación. La mezcla de incubación contenía en un volúmen final de 1 ml: 100  $\mu$ mol Tris-HCl, pH 8,3; 50  $\mu$ mol Na-EDTA,; 1  $\mu$ mol ditiotreitól, 30  $\mu$ moles amonio acetato, 10 nmol S-adenosil-L-[metil-<sup>14</sup>C] metionina; 0,4 - 0,8 nmol E. coli tRNA (cuando es necesario) y 2,5 - 3,0 mg de proteína (139, 157). La incubación se llevó a cabo durante 45 minutos a 37° C, y la reacción se detuvo por adición de un volúmen de 88% fenol que contenía 0,1 M sodio acetato pH 5,1. Después de la extracción fenólica y de la adición de 100  $\mu$ g de tRNA portador de E. coli, el tRNA se precipitó por adición de 2,5 volúmenes de alcohol absoluto y la solución se incubó durante la noche a -20°C. El tRNA

fue recuperado por centrifugación y sometido a lavado dos veces con 67% (v/v) etanol que contenía 0,1 M sodio acetato, pH 5,1. El precipitado final fue suspendido en agua, transferido a un tubo en combustión Carius 25 (l) por 1,5 (d) cm, y el contenido sometido a liofilización. El residuo seco fue suspendido en 1 ml de ácido trifluoroacético, el tubo de combustión sellado y su contenido hidrolizado de acuerdo a la técnica de Klagsbrun (136). El tubo Carius fue abierto a la temperatura ambiente, el ácido trifluoroacético evaporado bajo la presencia de un ambiente saturado de N a temperatura ambiente y el residuo seco suspendido en 10  $\mu$ l de agua.

#### Cromatografía sobre capa final de las bases metiladas

Las muestras fueron depositadas sobre placas de celulosa (20 x 20 cm) y la cromatografía se desarrolló en la primera dirección con una mezcla que contenía metanol: HCl concentrado: agua (70 : 20 : 10 en volúmen); luego, las placas fueron secadas (3 hrs) y cromatografiadas en la segunda dirección en n-butanol : ácido acético glacial : agua (68 : 17 : 17 en volúmen). La migración del frente de solvente fue 14 cm a contar del origen. Una vez finalizada la cromatografía las placas fueron autoradiografiadas sobre un film de rayos X, tipo RB-54 (Eastman Kodak, Rochester, NY), usando una exposición de 17 a 27 días; las áreas radioactivas fueron recuperadas de la placa suspendidas en H<sub>2</sub>O destilada 1 ml, sonicadas por 10 minutos y centrifugadas a 3.000 x g durante 10 minutos. La solución obtenida fue con-

centrada por liofilización y recromatografiada en presencia del standard no radioactivo en capa delgada. La separación de 7-metil guanina y 1-metil guanina se llevó a cabo por medio de cromatografía de capa fina, usando para ello la mezcla de solventes necesaria para resolver el cromatograma en la segunda dirección. La radioactividad recuperada después de la cromatografía de capa fina, fue determinada una vez que las muestras se mezclaron con 10 ml de Scintisol completo (Isolab., Inc., Akron, Ohio).

#### Albúmina metilada Kieselguhr (MAK)

Las columnas MAK fueron preparadas de acuerdo a Mandell y Hershey (158). La columna usada para el fraccionamiento de tRNA se componía de 3 capas. La capa de fondo contenía aproximadamente 2,5 mg de albúmina por gramo de Kieselguhr, mientras que la capa mediana tenía 0,7 mg por gramo. La capa superior solo contenía Kieselguhr y servía como capa protectora.

El material de la columna fue suspendido en una solución tampón que contenía 0,2 M NaCl, 0,05 M Na fosfato.

Esta suspensión fue hervida y enfriada antes de ser cargada en la columna. La columna (10 x 2 cm) se equilibró con un tampón que contenía 0,05 M fosfato de sodio, pH 7,0 y 0,2 M NaCl.

Fracciones de 4 ml se obtuvieron de esta columna.

### Preparación de RNA citoplasmático

Cortezas cerebrales de rata fueron homogenizadas en 3,5 volúmenes de solución tampón que contenía: 0,25 M sacarina, 0,035 M Tris-HCl, 0,025 M KCl y 5 mM MgCl<sub>2</sub> (pH 7,4) y se centrifugó a 10,000 x g durante 15 min para sedimentar la fracción nuclear y mitocondrial (159). Los 3/4 superiores de sobranate obtenido después de la centrifugación, fueron utilizados para la extracción del RNA citoplasmático. La fracción citoplasmática se mezcló con 1/10 de volumen de una solución 5% peso/volumen Na dodecil sulfato y con un volumen igual de una solución: fenol-m-cresol-agua (70 : 10 : 20 v/v), que contenía 0,1% (peso/volumen) 8 hidroxiquinolina. La mezcla obtenida fue incubada a 65°C durante 10 min y luego a temperatura ambiente durante 15 min. Después de su centrifugación a 12.000 x g durante 10 min a 4°C, la fase fenólica fue removida dejando solamente la fase acuosa y la interfase. La fase acuosa la interfase fueron de nuevo extraídas con una mitad de volumen de la mezcla fenólica durante 10 min a temperatura ambiente. La fase acuosa fue recuperada por centrifuga

ción y re-extraída con una mezcla fresca fenol-cresol-agua, como se describió previamente y esta etapa se repitió hasta no ver formación de material precipitado blanco en la interfase después de la centrifugación, esto para asegurar la deprotinización de la preparación de RNA. El RNA se precipitó desde la fase acuosa con 2 volúmenes de etanol absoluto previamente refrigerado a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 12 hrs.

El precipitado conteniendo RNA se recuperó por centrifugación y luego sometido a lavado dos veces con una solución que contenía 70% etanol y tampón 0,1 M Na acetato, pH 5,1. El pellet obtenido se resuspendió en una solución 1 mM  $\text{MgCl}_2$  y 0.01 M Tris-HCl (pH 8,5) y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 4 horas para deacilar el tRNA. El tRNA ribosomal contenido en esta preparación, fue eliminado por adición de una solución concentrada de NaCl (concentración final 2 M NaCl e incubado con agitación a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 8 hrs), el material que permaneció en solución fue recuperado por centrifugación al igual que previamente y luego precipitado con 2 volúmenes de etanol 75% v/v que contenía 0,1 M Na acetato, pH 5,1 e incubado durante la noche a  $-20^{\circ}\text{C}$ . El tRNA precipitado se

resuspendió en 2 ml de una solución que contenía 1 mM  $MgCl_2$  y 1 mM Tris-HCl (pH 7,0) y luego dializado extensivamente contra 2 lt de esta misma solución. El dializado obtenido fue conservado a  $-20^{\circ}C$  hasta ser utilizado.

#### Determinación de la concentración protéica

La concentración de proteína fue determinada por el procedimiento descrito por Lowry y colaboradores (160), utilizando albúmina sérica de bovino cristalizada como proteína patrón.

#### Cromatografía de hidrolizado de tRNA en una columna Dowex-50

El tRNA se hidrolizó en 3 ml de 1 N HCl a  $97 - 99^{\circ}C$  por 30 min y el hidrolizado obtenido fue aplicado sobre una columna de intercambio iónico (0,9 x 8,5 cm), Bio Rad AG 50W-X8 (200 - 400 mesh) previamente equilibrada con una solución 3,6 M  $NH_4$  acetato (pH 4,5) (161). La elución del hidrolizado de tRNA se llevó a cabo con el mismo buffer y a una velocidad de 1 ml/min. La radioactividad en las fracciones eluidas, se determinó en presencia de 10 ml de Scintisol completo.

### Centrifugación de tRNA en gradiente de sacarosa

El tRNA obtenido fue caracterizado por un gradiente lineal de sacarosa (5% a 30%) que contenía además, 0,1 M NaCl, 0,01 M Tris-HCl (pH 7,5), 0,001 M Na-EDTA y 0,5% peso/volumen sodio dodecil sulfato (162). El gradiente se centrifugó a 40.000 rpm en una centrifuga Spinco, utilizando el rotor SW-41 durante 6 hrs a 20°C. El tRNA obtenido fue medido determinando la absorbancia a 260 nm de las fracciones recuperadas a partir de la gradiente.

### Preparación de aminoacil-tRNA sintetasa

Las cortezas cerebrales de ratas machos de 8 días de edad, se homogenizaron en 3 volúmenes de tampón que contenía 0,01 M Tris-HCl (pH 7,5) 0,01 M KCl, 0,001 M MgCl<sub>2</sub>, 0,001 M glutatona y 0,25 M sacarosa (163, 164). El homogenizado se centrifugó a 105.000 x g durante 120 min. El sobrenadante así obtenido, fue depositado sobre una columna Sephadex G-100 (medium), que había sido equilibrada con un buffer que contenía 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,5). La muestra eluyó con la misma solución y fracciones de 4 ml fueron obtenidas a partir del eluido de la columna.

La actividad sintetásica contenida en el primer pico y la primera mitad del segundo pico de absorción a 280  $\mu\text{m}$  fueron reunidas y luego aplicadas sobre una columna de DEAE-celulosa del tipo fibroso (Schleicher and Schuell) la cual tenía un  $\text{bed volume}$  de 10 ml por cada 30 mg de proteína aplicada. La columna de celulosa se equilibró con la misma solución utilizada en la cromatografía Sephadex G-100 con la excepción de  $\beta$ -mercaptoetanol, el cual se sustituyó por 2 mM glutatona en la columna de DEAE-celulosa. Una vez que la muestra fue aplicada a la columna, 100 ml de solución tampón de equilibración fueron pasados a través de la columna y luego los aminoacil tRNA sintetasa eluidas con una solución que contenía 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 6,5) 0,25 M KCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM glutatona y 15% (v/v) glicerol.

La actividad contenida en las fracciones se midió por medio de la aminoacilación de tRNA de E. coli y luego las fracciones activas reunidas llevadas a 0,1 mM NaATP y luego repartidas en pequeñas alícuotas para ser conservadas a  $-70^\circ\text{C}$ .

#### Aminoacilación de tRNA

Para determinar la velocidad de aminoacilación, la reacción se llevó a cabo en un volumen de 0,5 ml conteniendo 50  $\mu\text{mol}$  Tris HCl (pH 7.5), 1 mM ditiotreitól, 5 - 15 mM Mg acetato, 4 - 12 mM ATP, 0,2 - 0,4  $A_{260}$  unidades de tRNA, 0,1 - 0,2 mg de proteínas y 15  $\mu\text{Ci}$  [ $^3\text{H}$ ] leucina (20  $\mu\text{M}$ ).

La mezcla de aminoacilación se incubó a 37°C y alícuotas de 100  $\mu$ l fueron retiradas a intervalos y precipitadas sobre papel Whatman 3 MM con ácido tricloroacético al 5% (TCA). Los filtros conteniendo las muestras se lavaron dos veces con 5% TCA 2 veces con una mezcla etanol-éter (1:1 v/v) y luego secados con el calor de una lámpara infraroja. La radioactividad de los filtros se midió en presencia de líquido de centelleo conteniendo tolueno.

#### Cromatografía de tRNA sobre DEAE-celulosa

El tRNA recuperado después de la extracción fenólica y precipitación con etanol fue redisolto y aplicado sobre una columna de DEAE-celulosa, del tipo granular 52 (Whatman) (4 x 0,8 cm), previamente equilibrada con una solución 0,1 M sodio acetato pH 5,0, 0,2 NaCl (165). Después de aplicar el tRNA sobre la columna, ésta fue lavada con una solución 0,3 M NaCl contenido en el mismo buffer y luego el tRNA eluído con un gradiente lineal de 60 ml entre 0,3 y 1,0 M NaCl disueltos en el mismo buffer. El tRNA presente en las fracciones de 1 ml fue determinado por su absorción característica a 260 nm.

#### Preparación de cuerpos celulares neuronales

El procedimiento ha sido descrito en detalle con anterioridad (156). Las células nerviosas fueron aisladas por

filtración de tejido nervioso previamente cortado en pequeños trozos a través de filtros de gasas de diferente diámetro (300 - 70  $\mu$ ) seguido por centrifugación del filtrado en una gradiente discontinua de sacarosa. El sobrenadante de alta velocidad a partir de células neuronales se obtuvo por homogenización de cuerpos celulares neuronales purificados como se describió previamente y luego homogenizado en 3 volúmenes de 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM ditioneitol y 0.1 mM Na-EDTA. El homogenizado obtenido fue centrifugado a 165.000 x g por 120 min (157).

### 2.3 RESULTADOS

La incorporación de grupos [metil- $^{14}\text{C}$ ] como producto precipitable en medio ácido fue lineal en el rango comprendido entre 20 - 300  $\mu\text{g}$  de proteínas. La relación lineal se mantuvo entre 7 min y 45 min de incubación (Fig. 6).

Incubación de extractos de corteza cerebral de rata con S-adenosina-L- [metil- $^{14}\text{C}$ ] metionina con o sin tRNA E.coli y con o sin espermidina, dio origen a 4 perfiles de metilación en función del tiempo (Fig. 7a). La metilación homóloga fue mucho menor que la metilación heteróloga (Fig. 7A, 7B). Aún más, mientras que la metilación total procedía de una manera lineal durante el tiempo de incubación, la metilación homóloga dejó de ser lineal después de un período de incubación de 15 min (Fig. 7A, 7B). También, como lo demuestran las Figs. 7A y 7B, la presencia de espermidina inhibió la metilación homóloga en corteza total de cerebro de rata y en células neuronales aisladas, aún cuando los procesos de metilación heterólogas correspondientes se vieron estimuladas por la presencia de espermidina. De una manera similar, los perfiles de metilación obtenidos con enzimas derivadas de células neuronales demostraron que espermidina aumentaba la metilación heteróloga e inhibía la metilación homóloga. En este

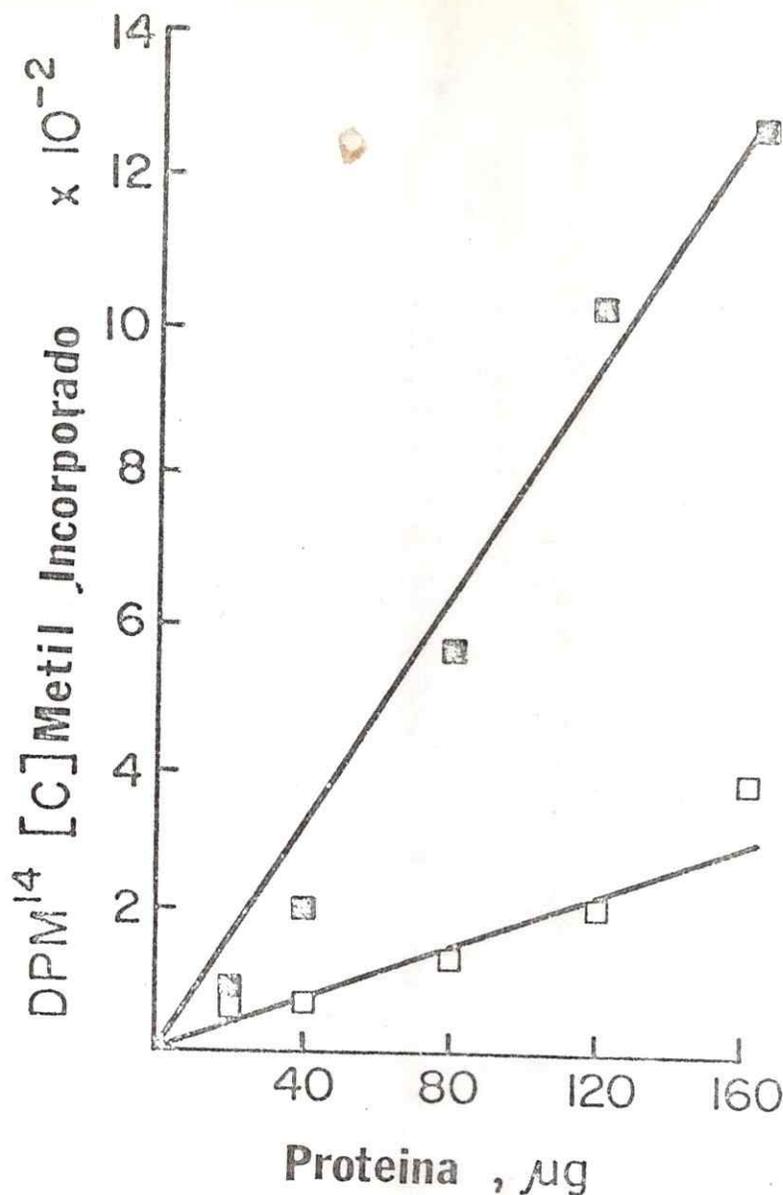


Figura 6. La metilación enzimática del tRNA *E. coli* en función de la concentración proteica. La actividad de las tRNA metiltransferasas de corteza cerebral de 8 días de edad fué determinada por el ensayo de "velocidad" usando diferentes concentraciones de proteínas. Se tomaron alicuotas de 35  $\mu$ l de la mezcla de incubación para su procesamiento de acuerdo a lo indicado (ver Métodos Sección 2.2).

10  $\mu$ l de *E. coli* tRNA fueron agregados a la mezcla de incubación.  $\square$ --- $\square$  : 7 min. de incubación;  $\blacksquare$ --- $\blacksquare$  : 45 min. de incubación. Los valores representan promedios de 3 determinaciones con menos de 10% variación.

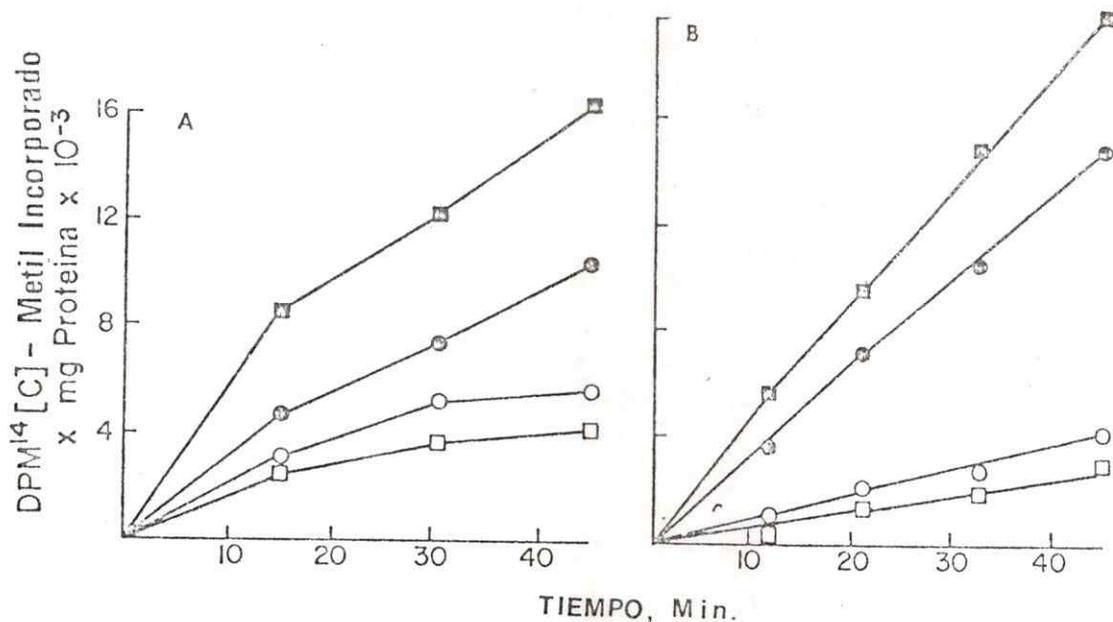


Figura 7. Efecto de espermidina en la metilación endógena total. Las tRNA metiltransferasas de corteza cerebral de 8 días fueron ensayadas en "velocidad". Se tomaron alicuotas de 35  $\mu$ l desde la mezcla de incubación a intervalos para ser procesadas como se indicó (ver Métodos Sección 2.2).

A) Enzimas derivadas de corteza cerebral total;

B) Enzimas derivadas de cuerpos celulares neuronales (156).

--- : metilación endógena; --- : metilación endógena en presencia de 2,5 mM espermidina;

--- : 10  $\mu$ g *E. coli* tRNA fue agregado a la mezcla de incubación; --- : como ---, más 2,5 mM espermidina. Los valores representan promedios de 3 determinaciones con menos de 10% variación.

último caso, sin embargo, las diferencias con respecto a los controles sin espermidina, fueron menos notorias que cuando se utilizaron extractos obtenidos de corteza cerebral total (Fig. 7B).

Los próximos experimentos fueron diseñados para caracterizar la naturaleza de los productos formados en el proceso de metilación homóloga (sin E. coli tRNA).

La Fig. 8 muestra la sensibilidad hacia ribonucleasa pancreática de los productos obtenidos a partir de metilación homóloga. En este experimento, 20  $\mu$ g de ribonucleasa fueron pre-incubados con sobrenadante de alta velocidad de cerebro a 37°C durante 30 min, tiempo al que se adicionó S-adenosil-L- [metil-<sup>14</sup>C] metionina para luego los tubos ser reincubados a 37°C. El tubo experimental (con RNAasa) contenía (30% menos radioactividad ácido insoluble que el tubo control (sin RNAasa), hecho que demostraba la formación de [metil-<sup>14</sup>C] RNA in el proceso de metilación homóloga.

Un experimento análogo (no mostrado) pero en presencia de DNAasa nos permitió concluir que no hay formación de [metil-<sup>14</sup>C] DNA.

En un protocolo similar, se incubaron fracciones sobrenadantes de cerebro, durante 40 min a 37°C en la presencia de S-adenosil-L-[metil-<sup>14</sup>C] metionina. Después de los 40 min la mezcla de reacción se dividió en dos fracciones iguales: a la fracción a) se le agregaron 20  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O y a la fracción b) se le agregaron 20  $\mu$ l de pronasa (1  $\mu$ g/  $\mu$ l) y la incubación siguió

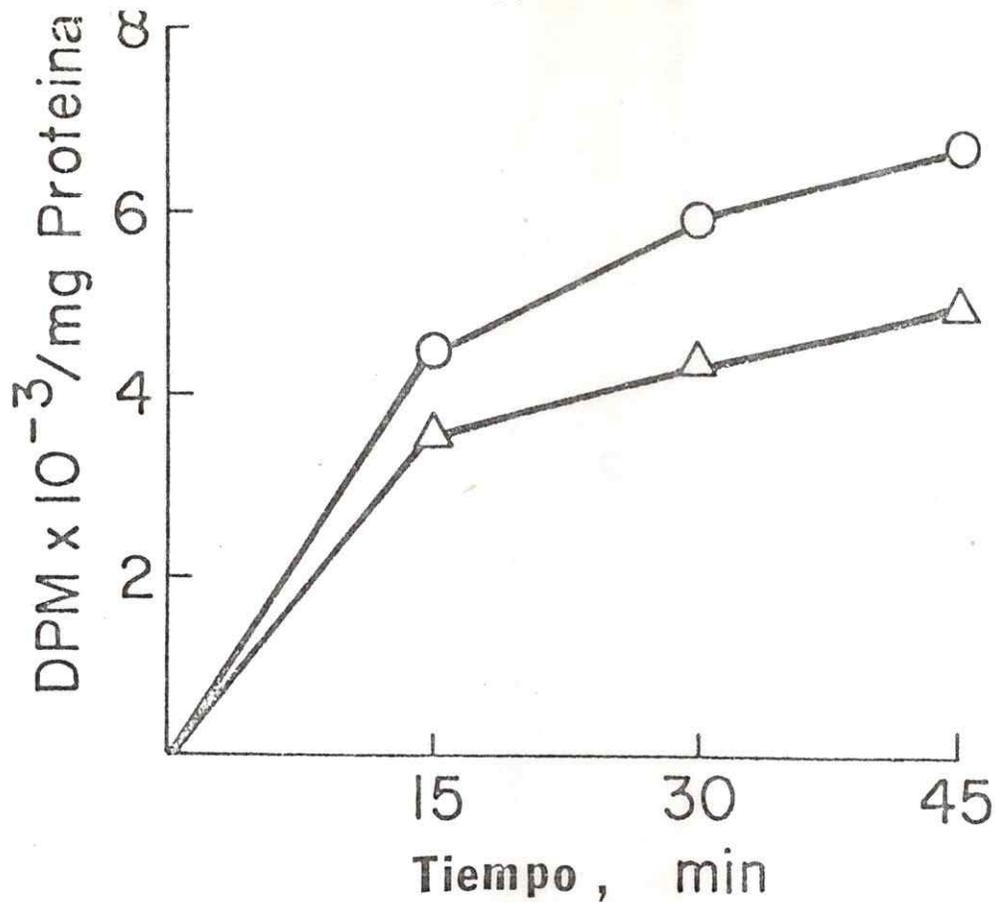


Figura 8. Efecto de ribonucleasa en la metilación endógena. Se agregaron 20  $\mu$ l de ribonucleasa pancreática a sobrenadantes después de una centrifugación a alta velocidad (2 alícuotas) preparados a partir de animales de 8 días. Ambos ensayos fueron preincubados a 37°C durante 20 min. Luego a cada una de las fracciones se le agregó 7 nmol de S-adenosil-L-(metil  $^{-14}\text{C}$ ) metionina y la incubación continuó de acuerdo a lo indicado en la figura.

○ --- ○ : libre de ribonucleasa;  $\Delta$  ---  $\Delta$  más ribonucleasa.

Los valores representan promedios de 3 experimentos con menos de 10% variación.

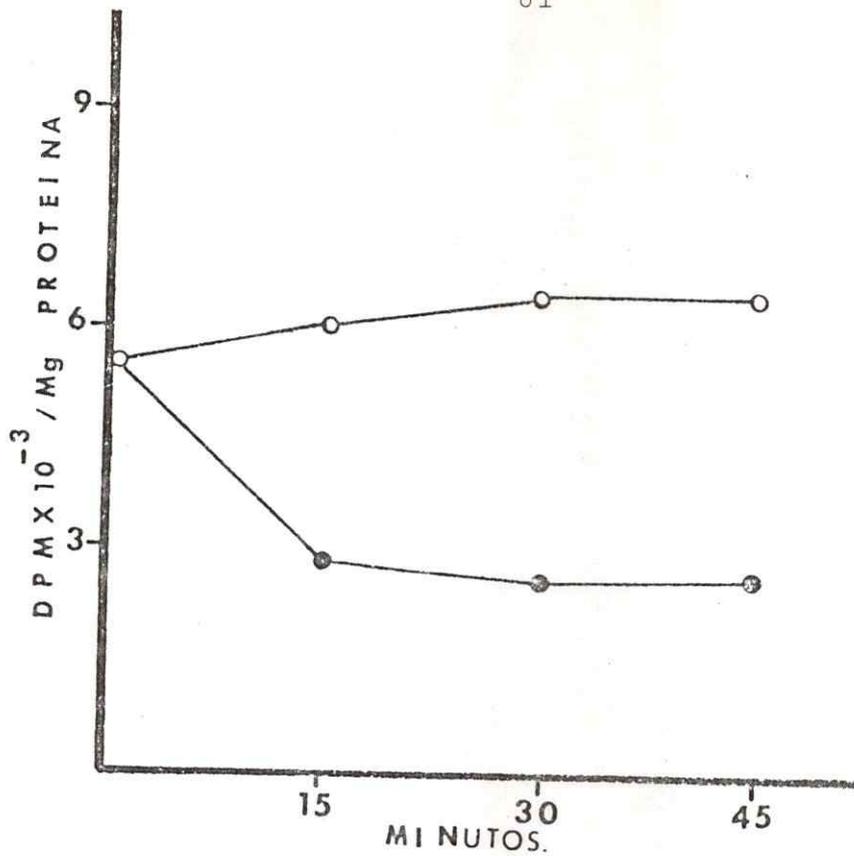


Figura 9. Efecto de pronasa B en la metilación endógena. El sobrenadante de alta velocidad de corteza cerebral (2 fracciones) preparado a partir de animales de 8 días fué incubado 40 min. a 37°C. Al llegar a este punto 20  $\mu$ l de pronasa (1 mg/ml) se agregó a una de las fracciones y la incubación continuó. A los controles se le agregó 20  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O. Las alicuotas de ambos experimentos se procesaron a distintos intervalos de acuerdo a lo descrito en los Métodos Sección 2.2.

Fracción a: ○ --- ○  
 Fracción b: ● --- ●

un tiempo adicional. A continuación, alícuotas de a) y b) se retiraron a diferentes intervalos. La Fig. 9 muestra los resultados obtenidos que indican la presencia de [metil- $^{14}\text{C}$ ] productos sensibles a la proteasa en el tubo b). Después de 30 min de incubación en presencia de pronasa se observó una reducción equivalente al 65% de los [metil- $^{14}\text{C}$ ] productos precipitables en medio ácido.

La naturaleza química de los productos obtenidos por metilación homóloga fue también caracterizada por métodos cromatográficos; albúmina metilada kieselguhr (cromatografía MAK) de los [metil- $^{14}\text{C}$ ] productos formados por la metilación homóloga reveló una cantidad considerable de radioactividad cuya elución coincidía con la de el tRNA E. coli utilizado como marker. Este tRNA fue agregado inmediatamente con anterioridad a la cromatografía (Fig. 10).

En el caso de la metilación heteróloga una cantidad mucho mayor de radioactividad eludió con el tRNA E. coli (Fig. 11).

Inicialmente, se intentó determinar la composición de los hidrolizados de [metil- $^{14}\text{C}$ ] tRNA, por medio de la hidrólisis ácida. Los hidrolizados ácidos de [metil- $^{14}\text{C}$ ] tRNA (161) formados después de una metilación homóloga o heteróloga fueron cromatografiados en forma separada en Dowex-50W-X8; 200 - 400 mesh. El registro de densidad óptica a 254 nm reveló la existencia de 4 picos (Figs. 12 y 13). El primer

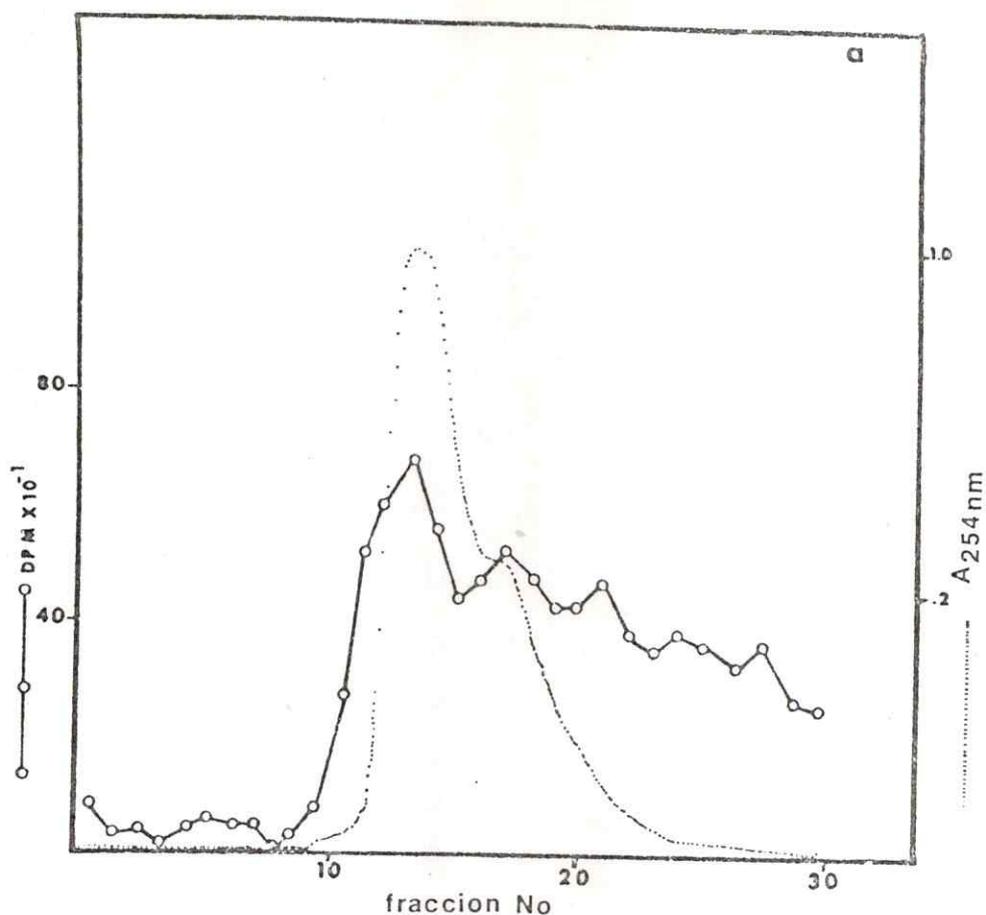


Figura 10. Cromatografía MAK de los (metil <sup>-14</sup>C) productos formados por metilación endógena. La columna (2 x 10 cm.) fué preparada como se describió en los Métodos Sección 2.2 y equilibrada con 0,2 M NaCl en 0,05 M sodio fosfato, pH 7,0. Los (metil <sup>-14</sup>C) productos formados durante la incubación fueron fenolizados y precipitados con etanol en presencia de tRNA de E coli, el cual se agregó como carrier.

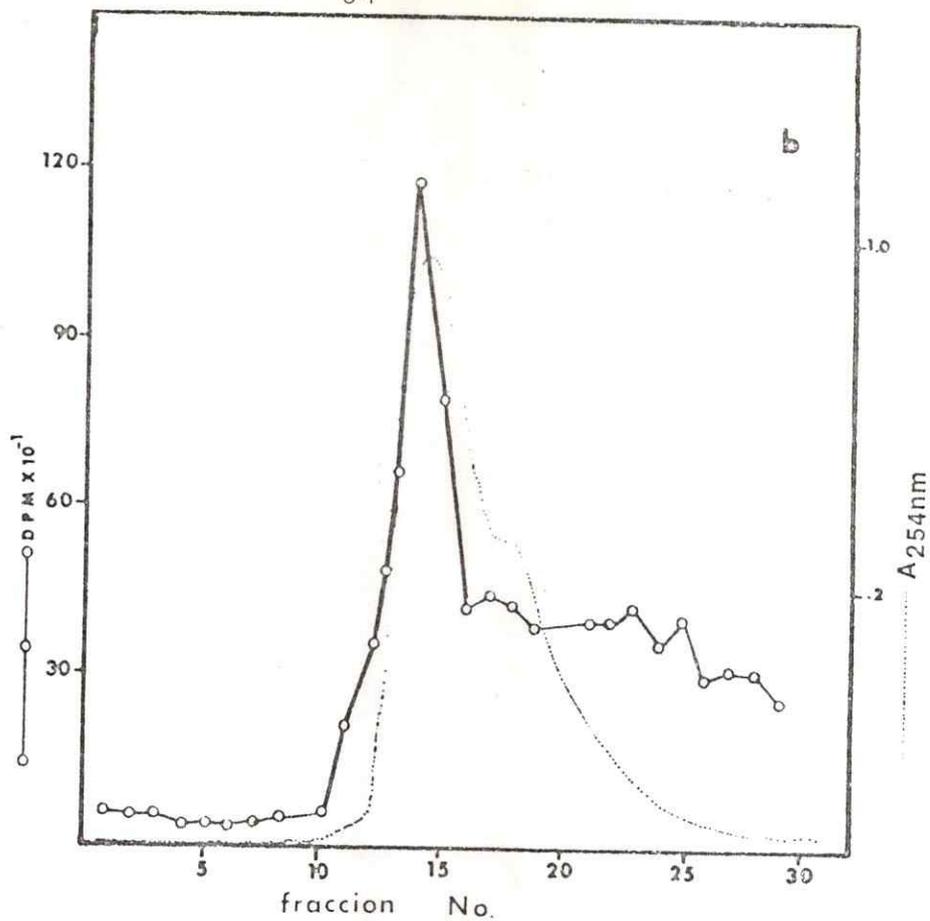


Figura 11. Cromatografía MAK de los (metil -<sup>14</sup>C) productos formados por metilación heteróloga. Las condiciones experimentales fueron las mismas descritas en la leyenda de la Figura 10.

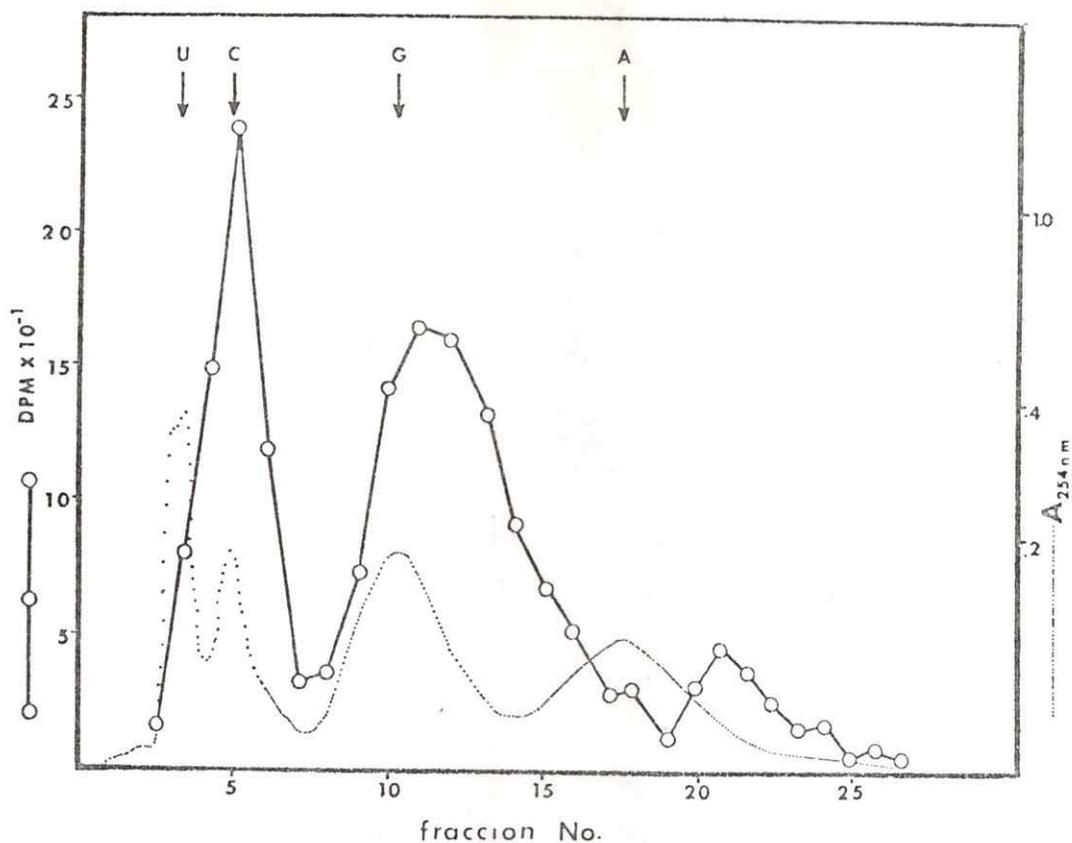


Figura 12. Cromatografía de intercambio iónico de los (metil <sup>14</sup>C) productos derivados de una metilación homóloga. El hidrolizado se aplicó a una columna Dowex-50 (ver Métodos Sección 2.2). La radioactividad en cada tubo fue determinada después de mezclar 2 ml de efluente con 10 ml de Scintisol completo (Isolab, Inc., Akron, Ohio).

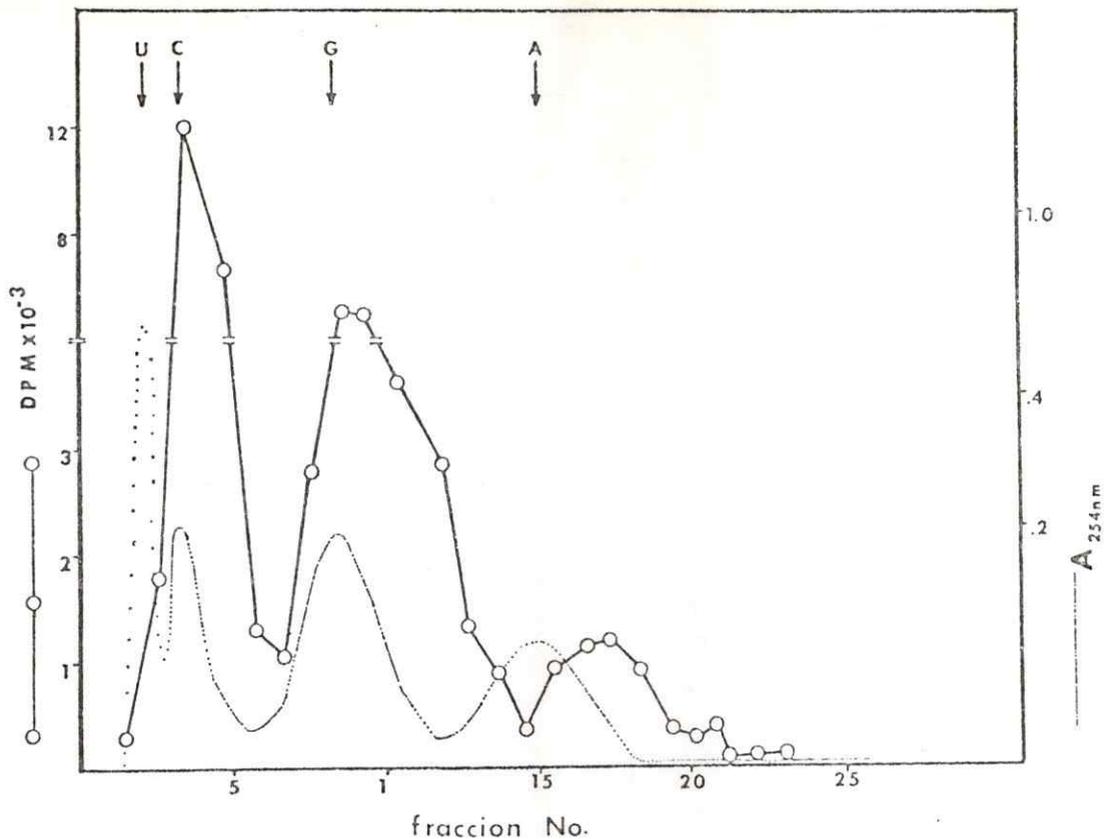


Figura 13. Cromatografía de intercambio iónico de los (metil <sup>14</sup>C) productos derivados por metilación heteróloga. El hidrolizado se aplicó a una columna Dowex-50 (ver Métodos Sección 2.2). Las condiciones experimentales fueron las mismas que las descritas en la leyenda de la Figura 12.

pico  $A_{254\text{nm}}$  contenía uracilo y timina, mientras que citosina y sus derivados metilados aparecían en el segundo pico. Los picos 3° y 4° (Fig. 12 y 13) corresponden a guanina y sus derivados metilados seguidos por adenina y sus derivados metilados correspondientes.

El perfil de radioactividad por otra parte, mostró tres picos de radioactividad, el primero comigrando con citosina, el segundo con guanina y el tercero con adenina. Una diferencia substancial en la cantidad de radioactividad recuperada después de la cromatografía se observó cuando se analizaron experimentos de metilación homóloga y heteróloga, siendo estos últimos mucho más altos en el contenido de radioactividad (Figs. 12 y 13). Los resultados obtenidos indicaron que cantidades de radioactividad despreciable eluyeron en asociación con los derivados de piridina.

La evidencia concluyente indicando la formación de [metil- $^{14}\text{C}$ ] tRNA, después de una incubación en presencia o ausencia de E. coli tRNA fue entregada por los resultados obtenidos después de cromatografía bidimensional sobre capa fina de los hidrolizados de [metil- $^{14}\text{C}$ ] tRNA con ácido trifluoroacético..

En estos experimentos, la exposición de la placa cromatográfica sobre un film de rayos X (ver Métodos) por varios períodos de tiempo, siguió a la cromatografía bidimensional sobre capa fina de las [metil- $^{14}\text{C}$ ] bases de tRNA.

La Fig. 14 representa un autoradiograma de un hidrolizado obtenido a partir de la metilación homóloga [metil- $^{14}\text{C}$ ] tRNA sintetizado in vitro con una preparación de metiltransferasa de cerebro de tres días.

Los resultados muestran dos manchas de radioactividad identificadas como  $\text{N}^2$ -metil guanina (2) y (1+7)-metil guanina (1). Un tercer componente radioactivo (7), fue detectado pero su presencia no fue asociada con ninguno de los standard disponibles.

Encontraste, los autoradiogramas obtenidos a partir de un proceso de metilación heteróloga contenían 6 [metil- $^{14}\text{C}$ ] bases de tRNA en adición a las determinadas durante el proceso de metilación homóloga. Ellas son  $\text{N}^2$ -dimetil guanina, 5-metil citosina, 5-metil uracilo, 1-metil hipoxantina, 2-metil adenina y 1-metil adenina (Fig. 15).

Además, la separación de (1+7) metil guanina se llevó a cabo por recromatografía de estas bases una vez que ellas han sido extraídas del primer cromatograma con agua y recromatografiadas en la mezcla utilizada para desarrollar el cromatograma en la segunda dirección.

También hemos estudiado los efectos dependientes de la edad y la espermidina en la metilación tanto homóloga como heteróloga. Los resultados de estos experimentos (Fig, 16) mostraron una disminución uniforme en la metilación a lo largo del desarrollo del cerebro. La Fig. 16 también muestra que la

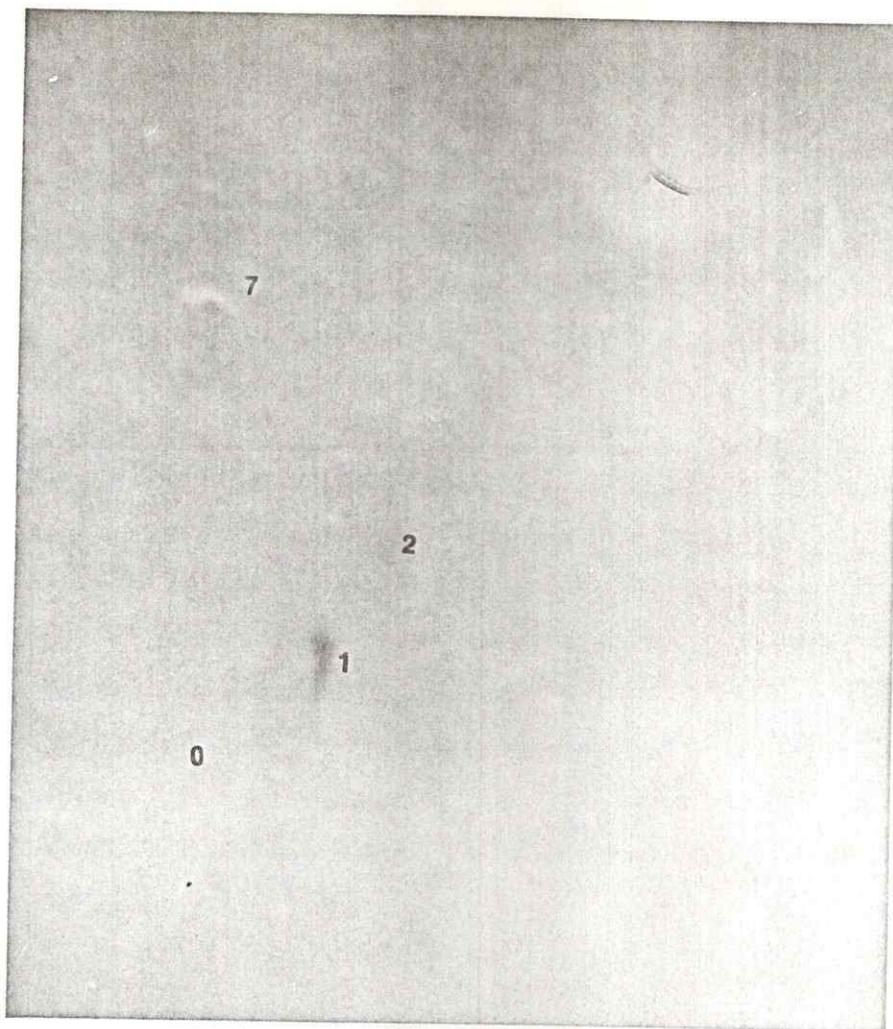


Figura 14. Cromatografía tridimensional sobre capa fina de los (metil  $-^{14}\text{C}$ ) bases formadas por metilación homóloga. Autoradiografía del hidrolizado en  $\text{CF}_3\text{COOH}$  de el (metil  $-^{14}\text{C}$ ) tRNA formado in vitro por tRNA metiltransferasas de 3 días de edad. La hidrólisis de el (metil  $-^{14}\text{C}$ ) tRNA purificado y la cromatografía (TLC) han sido descritas en los Métodos Sección 2.2. Los números designan lo siguiente: 0, origen; 1, (1+7-metil-guanina); 2,  $\text{N}^2$ -metil guanina; y 7, desconocido.

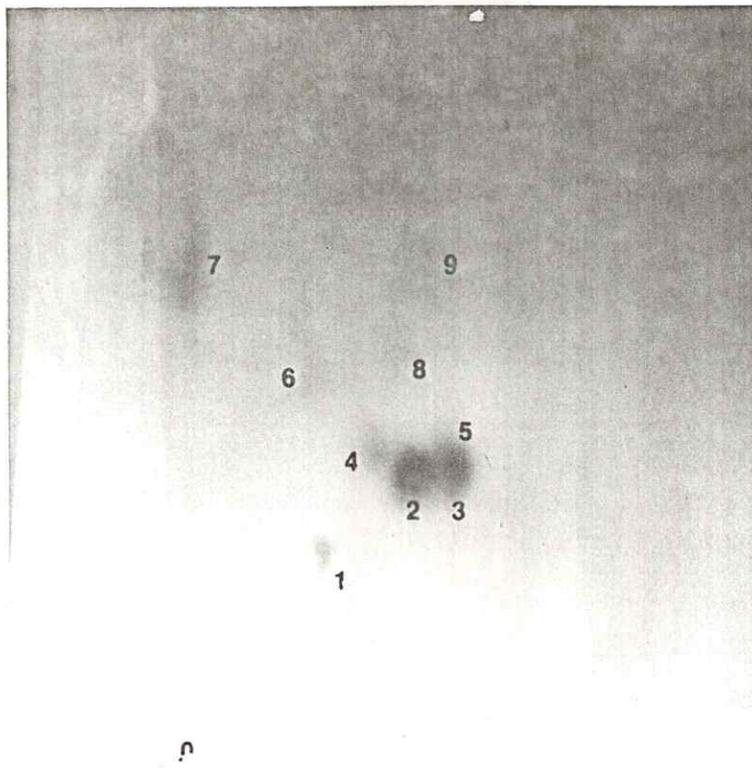


Figura 15. Cromatografía bidimensional en capa fina de las (metil  $-^{14}\text{C}$ ) bases formadas por metilación heteróloga. Las condiciones experimentales fueron las mismas que las descritas en la leyenda de la Figura 14. Los números designan lo siguiente: 0, origen; 1, (1+7-metil guanina); 2,  $\text{N}^2$ -metil guanina; 3,  $\text{N}_2^2$ -dimetil guanina; 4, 1-metil adenina; 5, 1-metil hipoxantina; 6, 2-metil adenina; 7, desconocido; 8, 5-metil citosina; y 9, 5-metil-uracilo.

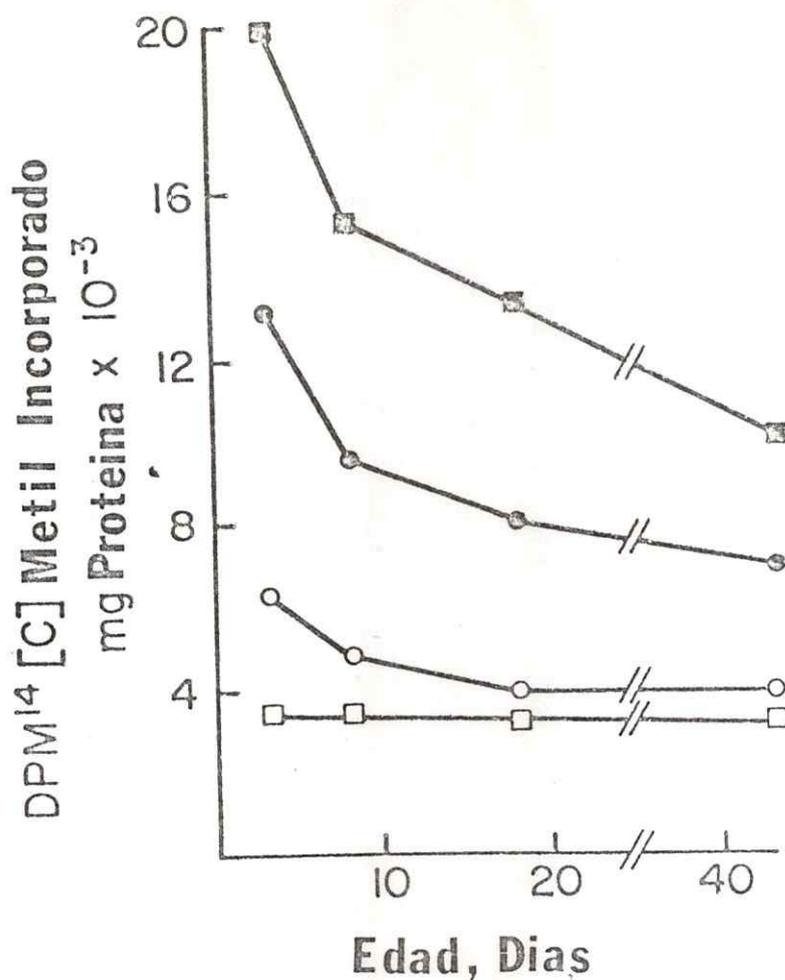


Figura 16. Cambios de la metilación en función de la edad: efecto de espermidina. Las tRNA metiltransferasas de corteza cerebral de 3, 8, 18 y 43 días de edad fueron ensayadas en "velocidad" (ver Métodos Sección 2.2). El tiempo de incubación fue 30 min.

○---○ : metilación endógena; □---□ : metilación endógena en presencia de 2,5 mM espermidina; ●---● : se agregó 10 µg de *E. coli* tRNA a la mezcla de incubación; ■---■ como ●---● , más 2,5 mM espermidina.

espermidina afectó la inhibición de la metilación homóloga de manera más marcada a los 3 días de edad, es decir, cuando el proceso de metilación mostraba su máxima rapidez, en tanto que la misma poliamina estimulaba la metilación heteróloga de una manera uniforme durante todo el período de desarrollo estudiado.

Una confirmación adicional de la correlación con la edad y el proceso de metilación, se obtuvo por medio de experimentos con preparaciones de metiltransferasa obtenidas a partir de corteza cerebral sometidas a diálisis intensa y con las cuales se estudió la capacidad de metilación de tRNA.

La metilación homóloga se estudió en el período comprendido entre 3 y 18 días de edad, usando cortezas cerebrales de ratas. Los radiocromatogramas muestran que este proceso se relacionaba de manera inversa con la edad de los animales estudiados.

Un estudio más completo del efecto de la edad en la distribución de las [metil- $^{14}\text{C}$ ] bases formadas durante la metilación homóloga muestran (Tabla 2) que 1-metil guanina y  $\text{N}^2$ -metil guanina fueron las únicas [metil- $^{14}\text{C}$ ] bases de tRNA obtenidas durante las 3 edades examinadas. Una evaluación cuantitativa de las proporciones relativas de cada base en función de la edad post-natal (Tabla 2) mostró que a los 3 días 1-metil guanina fue la [metil- $^{14}\text{C}$ ] base más importante mientras que a los 18 días, este papel lo tomó la [metil- $^{14}\text{C}$ ]

Tabla 2. Efecto del desarrollo en el cambio de la distribución de 1-[metil  $^{-14}\text{C}$ ] guanina y  $\text{N}^2$ -[metil  $^{-14}\text{C}$ ] guanina de tRNA homólogo metilado.\*

Edad (días)	Radioactividad total recuperada (%)		
	1-metil guanina	$\text{N}^2$ -metil guanina	N.I.**
3	52	20	28
8	23	45	32
18	19	53	28

\* El ensayo de capacidad de metilación y las condiciones para la cromatografía de capa fina se describieron en Métodos Sección 2.2

\*\* No identificado.

Tabla 3. La distribución de bases metiladas en tRNA de E. Coli después de una metilación in vitro con enzimas de distinto origen.

Procentaje de distribución.

Constituyentes metilados	Cerebro de rata.	Higado (138) de rata.	Células (58) tumorales.
1-metil guanina	5.1**	2	3.3
7-metil guanina	N.D.	3	1.7
N <sup>2</sup> -metil guanina	31.4	23	36.8
N <sub>2</sub> <sup>2</sup> -dimetil guanina	28.0	22	18.0
5-metil citosina	2.2	7	15.8
5-metil uracilo	2.8	7	0.2
1-metil adenina	24.3	29	20.8
2-metil adenina	3.3	N.D.	N.D.
1-metil hipoxantina	2.8	N.D.	N.D.

N.D. No detectado

\* Los datos se expresan como porcentaje de la radioactividad recuperada después de la cromatografía.

\*\* Enzima derivada de 3, 8, 18 y 43 días de edad, produjo la misma distribución de bases metiladas.

$N^2$ - metil guanina. Aproximadamente un 30% de la radioactividad recuperada a partir de las placas de TLC consistió en productos no identificados, independientemente de la edad de los animales.

En contraste con los resultados obtenidos a partir de la metilación homóloga, la distribución de [metil- $^{14}C$ ] bases sintetizadas por la metilación heteróloga fueron independientes de la edad en el período estudiado. En realidad no hubo cambios significativos en la distribución de bases metiladas entre cerebros de 3 vs 43 días en presencia de tRNA E. coli (Tabla 3). La metilación heteróloga total también disminuyó con la edad, al igual que la metilación homóloga (Fig. 16)..

La distribución de las [metil- $^{14}C$ ] bases que se forman por metilación heteróloga, se describe en la Tabla 3. La distribución en esta Tabla se compara con el patrón de metilación heteróloga obtenida en ausencia de espermidina cuando se usaron tRNA metiltransferasas obtenidas de otras fuentes distintas al sistema nervioso. Los resultados revelan la formación denominante de las siguientes [metil- $^{14}C$ ] bases :  $N^2$ -metil guanina,  $N^2$ -dimetil guanina y 1-metil adenina, las cuales en total suman alrededor de 85% de la radioactividad recuperada, el resto corresponde a 5- metil citocina, 5-metil uracilo, 2-metil adenina, 1-metil hipoxantina y 1-metil guanina. La presencia de [metil- $^{14}C$ ]-7-metil guanina no fue detectada en estos experimentos.

Utilizando un enfoque experimental distinto fraccionamos tRNA a partir de corteza cerebral de rata para probar su habilidad para aceptar in vitro [ metil- $^{14}\text{C}$  ] grupos provenientes de S-adenosil-L-metionina en una reacción in vitro. Varios criterios se utilizaron para establecer la pureza y calidad de la preparación de tRNA. Las figuras 17 y 18 muestran la velocidad de aminoacilación del tRNA cerebral como asimismo el perfil de absorción ultravioleta.

Cuando se utilizó una mezcla de aminoácidos no radioactivos que contenía [  $\text{H}^3$  ] leucina, el número de picomoles incorporados por unidad de densidad óptica de tRNA correspondió con los resultados publicados anteriormente (165-166). Finalmente, como lo muestra la Fig. 19, la centrifugación en gradiente de sacarosa (15 - 30%) indicaba que sobre un 90% del material aislado a partir de cerebro sedimentaba en la región de la gradiente que correspondía a 4S tRNA.

Cuando este tRNA purificado de acuerdo a los criterios descritos anteriormente y derivado a partir de corteza de rata de 18 días se incubó con S-adenosil-L-metionina y metiltransferasas de la misma edad, no hubo incorporación neta de [ metil- $^{14}\text{C}$  ] grupos en la fracción ácido precipitable (Fig. 20).

Otro tipo de experimento, DEAE-celulosa (microgranular 52, Whatman) se utilizó para estudiar el efecto de espermidina en la metilación homóloga y heteróloga de tRNA. Para este propósito columnas de DEAE-celulosa fueron equilibradas con 0.2 NaCl, conte-

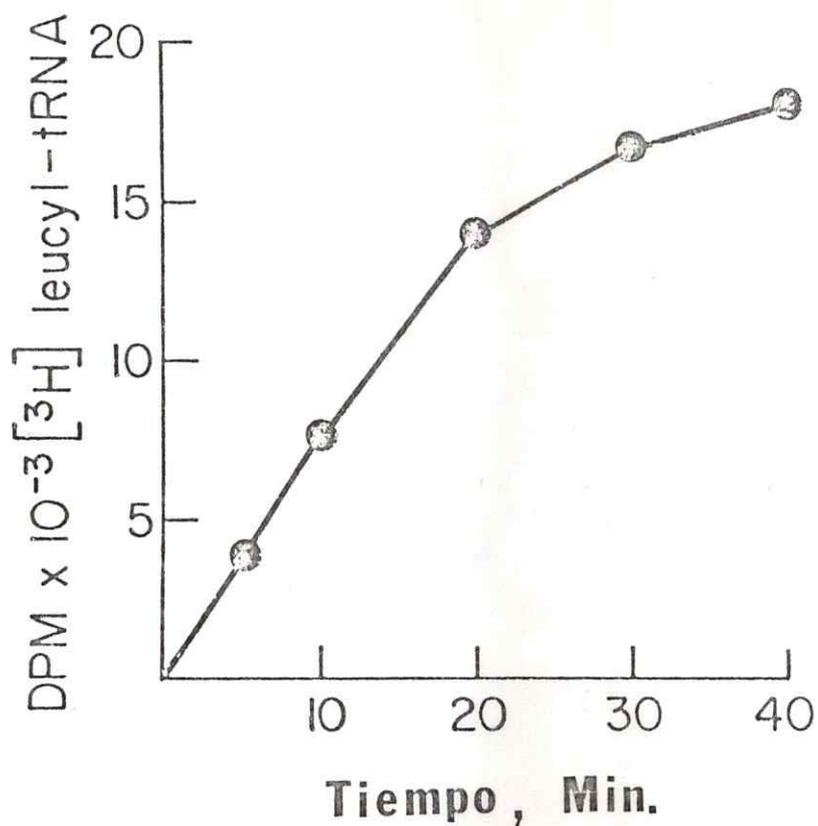


Figura 17. Cinética de incorporación de ( $^3\text{H}$ ) leucina en aminoacil-tRNA. La mezcla de reacciones (ver Métodos Sección 2.2) contiene  $15 \mu\text{Ci}$  ( $20 \mu\text{M}$ ) de ( $^3\text{H}$ ) leucina y fue incubada a  $37^\circ\text{C}$ . Luego alícuotas ( $100 \mu\text{l}$ ) fueron tomadas a diferentes intervalos como se describió en los Métodos Sección 2.2. Los resultados son un promedio de 3 experimentos con menos de 10% variación.

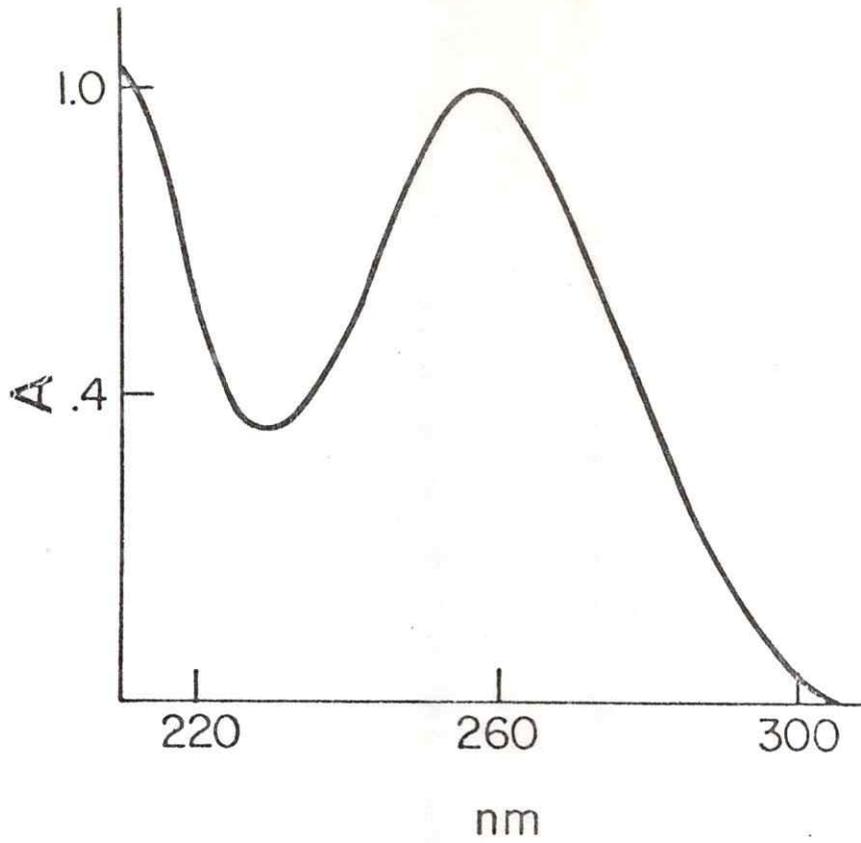


Figura 18. El espectro de absorción de tRNA cerebral. La solución de tRNA contenía 0,1 M Tris-HCl (pH 7,5) y 1 mM  $MgCl_2$ .

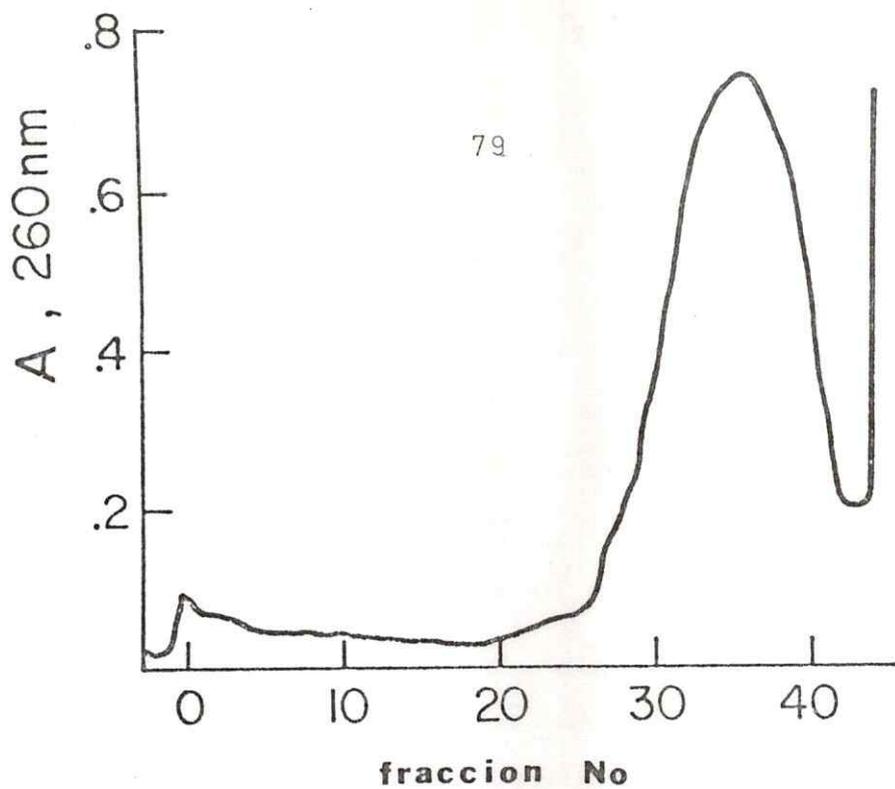


Figura 19. Centrifugación en gradiente de sacarosa de tRNA cerebral. El procedimiento (162) fue descrito en los Métodos Sección 2.2.

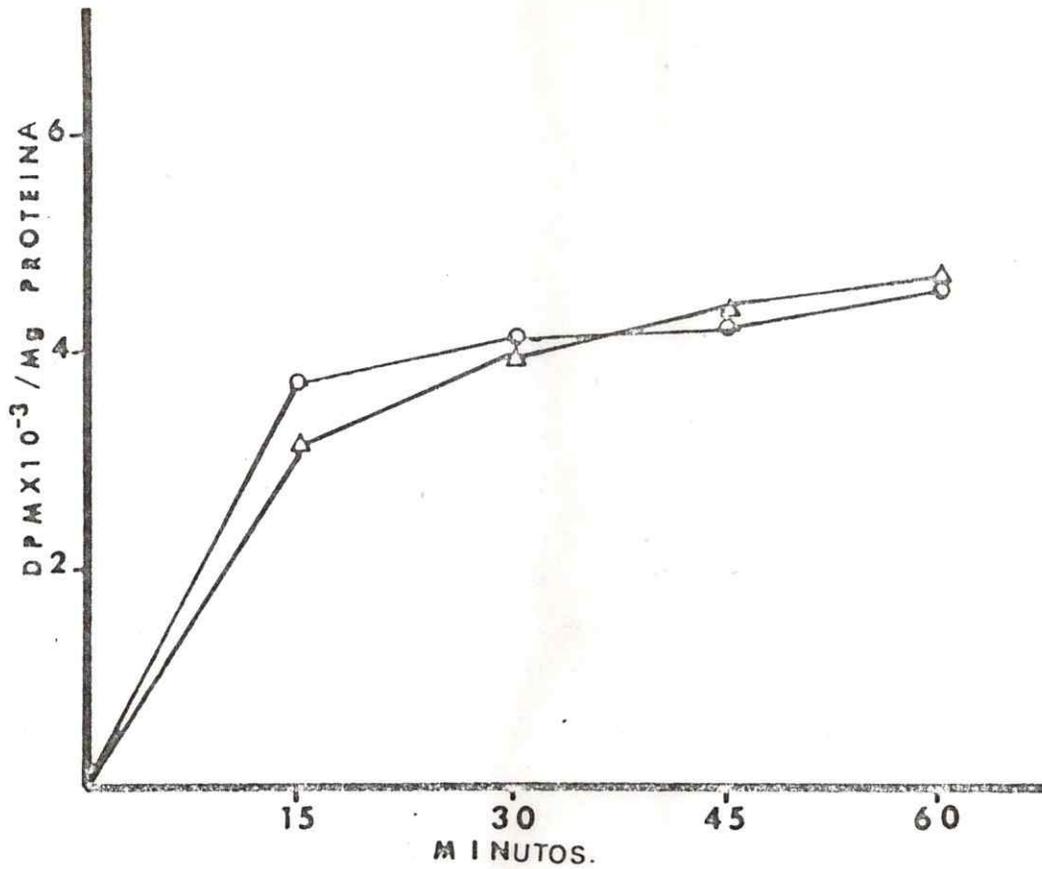


Figura 20. Efecto del tRNA cerebral en la metilación endógena. tRNA cerebral (10-40  $\mu\text{g}$ ) preparado de acuerdo a lo descrito en Métodos Sección 2.2. Se agregó a una mezcla de incubación que contiene sobrenadante de corteza cerebral de 18 días y S-adenosil-L-(metil  $^{-14}\text{C}$ ) metionina y que fue incubado a  $37^{\circ}\text{C}$ . En seguida se tomaron alicuotas (50  $\mu\text{l}$ ) a distintos intervalos para ser procesadas de acuerdo a lo descrito en los Métodos Sección 2.2. Círculos: controles; triángulos: +tRNA cerebral de 18 días.

niendo 0.1 M Na acetato (pH 5.0) como se describió en otra parte (69). Las muestras de tRNA fueron depositadas en la columna y eluidas con una gradiente lineal de sal (0.3 - 1.0 M NaCl).

La Fig. 21A, B ilustra los efectos de espermidina en la metilación homóloga de tRNA. Espermidina (2.5 mM), presente en la mezcla de incubación, inhibe la metilación homóloga de tRNA, mientras que los controles (sin espermidina) contenían radioactividad mensurable en la región correspondiente a tRNA. (Fig. 21A).

La metilación heteróloga, en cambio, fue estimulada por la presencia de la poliamina (2,5 mM) (Fig. 22A, 22B). Estos resultados confirman las observaciones previas ilustradas en las Fig. 7A, 7B y 8, respectivamente.

Hemos tratado además de establecer los patrones de metilación característicos de las células nerviosas, para así determinar si la metilación de tRNA varía según el tipo de célula nerviosa. La Tabla 4 esquematiza los resultados obtenidos en este tipo de experimentos. Vale destacar que espermidina aumentó la metilación heteróloga total en ambos tipos de preparaciones, como lo demuestra la radioactividad recuperada después de TLC. Sin embargo, este efecto estimulador dependió de la base metilada en cuestión (Tabla 4). Por ejemplo, 1- [metil- $^{14}\text{C}$ ] adenina en corteza total promediaba alrededor de 27% en ausencia de

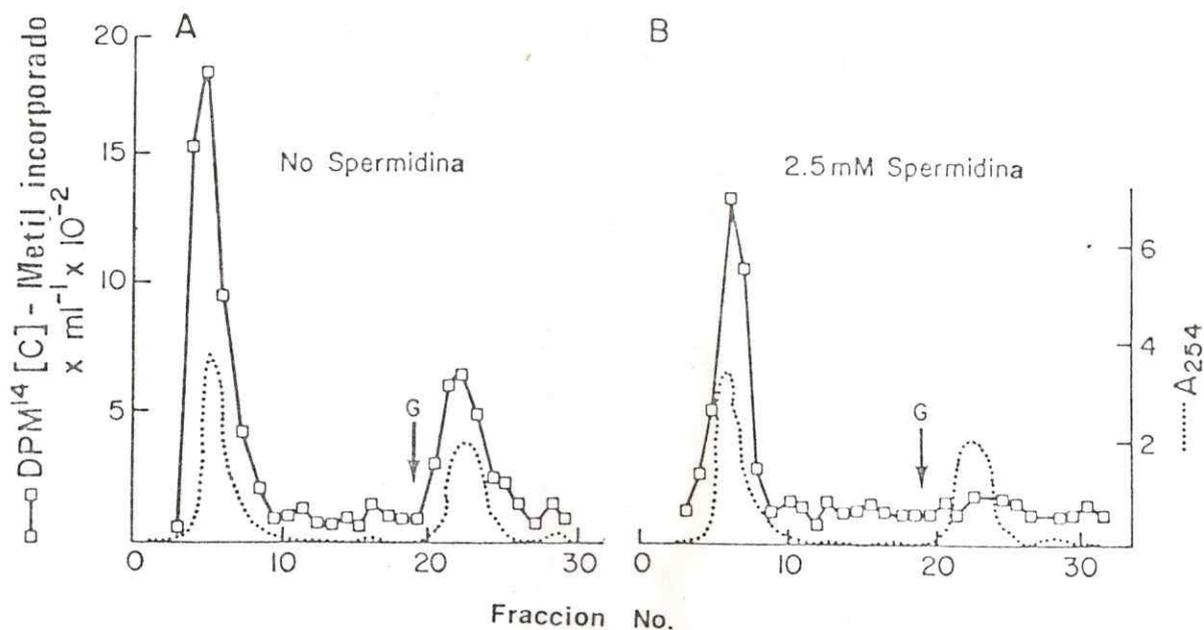


Figura 21. Cromatografía en DEAE-celulosa de los (metil <sup>-14</sup>C) productos formados por metilación endógena. Los (metil <sup>-14</sup>C) productos obtenidos por medio de un ensayo de "capacidad" de metilación total en presencia de tRNA metil-transferasas cerebrales fueron colocados en columnas, (1 x 3 cm) equilibradas con 0,1 M Na acetato, pH 5,0. Las columnas se lavaron con 0,3 M NaCl, en el mismo buffer. La radioactividad fue determinada en alicuotas de 0,1 ml de cada fracción. Espermidina: 2,5 mM. G: gradiente 0,3 - 1,0 M NaCl.

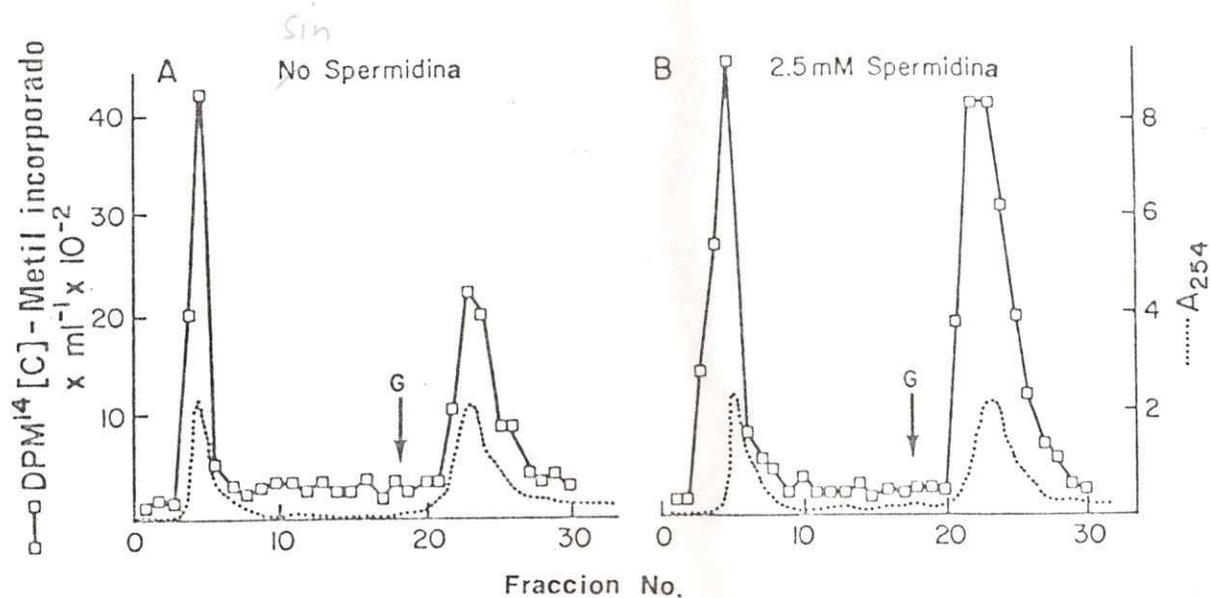


Figura 22. Cromatografía en DEAE-celulosa de los (metil <sup>14</sup>C) productos formados por metilación heteróloga. Las condiciones descritas en la Figura 21. se aplican en este caso, excepto que tRNA *E. coli* se agregó a la incubación (ver Métodos Sección 2.2). Espermidina: 2,5 mM. G: Gradiente 0,3 - 1,0 M NaCl.

Tabla 4. Efecto de la espermidina en la distribución de bases metiladas  
[metil  $^{14}\text{C}$ ] en tRNA de E. coli con metiltransferasas cerebrales

Constituyentes metilados	Porcentaje de distribución			
	Corteza total		Cuerpos celulares neuronales	
	-espermidina	+espermidina*	-espermidina	+espermidina
1-metil guanina	3.7	4.6	8.7	8.2
N <sup>2</sup> -metil guanina	22.8	27.7	10.7	20.8
N <sup>2</sup> -dimetil guanina	20.4	21.8	12.6	22.8
5-metil citosina	1.6	0.9	N.D.	N.D.
5-metil uracilo	1.8	0.8	N.D.	N.D.
1-metil adenina	17.7	6.2	42.7	24.6
2-metil adenina	2.4	1.5	N.D.	N.D.
1-metil hipoxantina	2.0	0.6	N.D.	N.D.
desconocido	27.6	35.9	25.3	23.6
dpm totales	3,360	14,656	2,276	9,396

\* 2,5 mM espermidina

N.D. no determinada

espermidina y 6,2% en presencia de poliamina, mientras que la misma base metilada formada durante la metilación con tRNA metiltransferasas derivadas de cuerpos neuronales presentaba un 42,7%, contra un 24,6% de esta base metilada obtenida en ausencia de la poliamina. Estos resultados indican que existen diferencias en el patrón de metilación heterólogos de tRNA mediado por las tRNA metiltransferasas de corteza total y de cuerpos celulares neuronales.

## 2.4 DISCUSSION

El tejido nervioso en desarrollo se caracteriza por un muy activo metabolismo de tRNA (12, 167, 168). De acuerdo a ésto, podemos esperar que los procesos de modificación post transcripcional de los que participa el tRNA sean también elevados durante el período post natal temprano de células nerviosas. La actividad tRNA metiltransferásica de corteza cerebral de rata fue proporcional a la proteína agregada en la mezcla de reacciones (Fig. 6). Pegg (1939) encontró una carencia de linealidad en la metilación de tRNA en función de la cantidad de proteína cuando ensayó tRNA metiltransferasas obtenidas a partir del tejido renal, aunque posteriormente Pegg y Hawks (1938) encontraron que la actividad metiltransferásica en tumor de colon en el ratón era proporcional a la concentración de proteína si una purificación por fraccionamiento con sulfato de amonio era realizado previo al ensayo enzimático.

Johnson y colaboradores (144) han determinado recientemente la actividad tRNA metiltransferasa de cerebro de ratón en la ausencia y presencia de tRNA E. coli, para encontrar proporcionalidad en función de la concentración de proteína solo cuando tRNA E. coli se encuentra presente en la mezcla de reacción.

Al hacer una comparación\* de las actividades específicas de las tRNA metiltransferasas en cerebro de ratón y rata, se encuentra un rango de 140 a 180 pmoles de [metil- $^{14}\text{C}$ ] incorporados por mg de proteína/90 min determinado a partir del ensayo de velocidad y calculado de las Figs. 6 y 7A, 7B para las ratas de 9 días de edad vs un rango poco más elevado de 220 - 280 pmoles de [metil- $^{14}\text{C}$ ] incorporados por mg de proteína/90 min determinado por medio de un ensayo de capacidad en presencia de 12 mM Mg para el ratón de 1 a 2 días de edad (144).

Este estudio muestra que la corteza cerebral de rata en desarrollo contiene tRNA metiltransferasa que catalizan de manera efectiva la metilación de macromoléculas aceptoras endógenas, observación que contrasta con reportes anteriores en que se niega la existencia de la metilación homóloga en el tejido renal adulto (139) y cerebro (141). Recientemente, Johnson y colaboradores (144), observaron niveles idénticos en la metilación proteica endógena durante los períodos neonatal y adulto en el cerebro de ratón. Como lo muestra la

\* Hemos supuesto diluciones idénticas de S-adenosil-L-[metil- $^{14}\text{C}$ ] metionina en la S-adenosil-L-metionina endógena de los extractos cerebrales respectivos.

Fig. 7A, 7B, la adición de tRNA E. coli a sobrenadantes de alta velocidad proveniente de corteza cerebral o células neuronales, produjo un gran aumento de la transferencia de [metil-<sup>14</sup>C] grupos, circunstancia que confirma la presencia en el cerebro inmaduro de rata de altas actividades tRNA metiltransferasas. El estudio de actividad metiltransferásica en función del tiempo, fue completamente lineal en las neuronas durante los períodos estudiados, no así en la corteza total durante el mismo período. Sin embargo, la diferencia más notable encontrada al usar cuerpos celulares neuronales en lugar de corteza cerebral total fue el aumento significativo en la diferencia entre la metilación heteróloga y homóloga (comparar los círculos llenos con los círculos vacíos de las Figs. 7A y 7B). Así, por ejemplo, después de 30 min, por cada 2000 dpm/mg de proteína en la corteza total había alrededor de 10.000 dpm/mg de proteína en la célula nerviosa.

Los efectos diferenciales de espermidina en las metilaciones homólogas y heterólogas (Figs. 7A, 7B), fueron de especial interés, así mientras que la estimulación de la metilación heteróloga confirma los resultados anteriores en que se muestra efectos similares producidos por la poliamina en sistemas no nerviosos (138, 139, 146, 147), la fuerte inhibición de la metilación homóloga, especialmente en los

cerebros de ratas de 3 días de edad (Fig. 16), puede atribuirse a la gran demanda de S-adenosil-L-metionina debido al rápido incremento en actividad de la S-adenosil-L-metionina decarboxilasa cerebral durante el desarrollo (169).

La similitud entre las  $K_m$  aparentes para S-adenosil-L-metionina de los tRNA metiltransferasas (12, 64) y de la S-adenosil-L-metionina decarboxilasa cerebral (170); ( $10^{-6}$ - $10^{-5}$ M) le otorga validez a esta teoría. De una manera alternativa, espermidina pudiera controlar selectivamente la metilación de tRNA en las células neuronales pero no afectar la metilación en las células gliales, idea cuyo fundamento puede resumirse en tres puntos:

- 1) Los elevados niveles de espermidina en algunas regiones cerebrales conocidos por contener una alta densidad en células gliales (171).
- 2) Los niveles más altos en glías que en neuronas de la enzima ornitina decarboxilasa (EC 4.1.1.17), enzima la cual es esencial en la biosíntesis de espermidina (172).
- 3) Las diferencias en el pattern de distribución de tRNA metiltransferasas, pertenecientes a células tumorales de distinto origen (173).

Albúmina metilada Kieselguhr (MAK) y DEAE-celulosa (69, 158) fueron los tipos de cromatografía empleados para demostrar que el tRNA cerebral podía ser metilado por las tRNA metiltrans

ferasas homólogas. Vale la pena destacar que la metilación homóloga de tRNA fue descrita primeramente en tejido hepático de rata adulta (58) y más recientemente, en tRNA E. coli alanina (174).

Los resultados de la cromatografía MAK (10 - 11), muestran una importante incorporación de la radioactividad coincidente con material que absorbe a 254 nm, dicho material eluye junto a tRNA E. coli utilizado como carrier (12 - 16), asimismo, hay una importante incorporación de radioactividad en el material que eluye después del tRNA. Cromatografías similares de extractos derivados a partir de incubación que contienen tRNA E. coli mostraron una distribución análoga, pero más intensa en su contenido de radioactividad.

La cromatografía en Dowex-50W-X8 de los hidrolizados obtenidos a partir de la metilación heteróloga u homóloga de tRNA mostró perfiles de radioactividad (Figs. 12 y 13) que contenían [metil-<sup>14</sup>C] guanina y en adición material radioactivo que eluía entre el peak correspondiente a uracilo y el peak correspondiente a citidina. En esencia, un pattern de radioactividad similar fue hallado en las fracciones derivadas a partir de la metilación heteróloga de tRNA (Fig. 13). Prueba adicional de la formación de [metil-<sup>14</sup>C] guanina durante la metilación homóloga es entregado por los resultados de

la cromatografía TLC obtenida a partir de un hidrolizado ácido de tRNA (Fig. 14), en cuyo caso se identificaron dos manchas de radioactividad (autoradiografía), identificadas como N<sup>2</sup>-metil guanina y (1 + 7) metil guanina.

En el curso de este trabajo, hemos demostrado que la adición de tRNA purificado a partir de corteza cerebral a la mezcla de incubación endógena no aumentó la incorporación de [metil-<sup>14</sup>C] grupos por sobre los valores encontrados en las mezclas en las cuales se omitió la adición de tRNA endógeno (Fig. 20). Simón y colaboradores (141), demostraron hallazgos similares en cerebro total de rata adulta. Recientemente, Jank y Gross (69) demostraron que la adición de tRNA purificado a partir de tejido hepático de rata normal a la mezcla de incubación homóloga produjo un 25% de aumento en la metilación de tRNA. Nuestra incapacidad para influenciar la metilación homóloga de tRNA por medio de la adición de tRNA purificado a partir de cerebro de rata de la misma edad significa que los tRNA nativos presentes en los sobrenadantes de corteza fueron más eficientes para aceptar grupos metilos que el tRNA purificado exógenos. No es posible concluir con estos resultados, si la mayor eficacia exhibida por el tRNA nativo endógeno se debió a la remoción durante el proceso de purificación del tRNA de una fracción pequeña pero activa como aceptora de grupos metilo (tRNA precursor)

(14, 175, 176), o a diferencias intrínsecas en la unión de los tRNA metiltransferasas con los tRNA nativos vs los tRNA homólogos una vez purificados.

Como muestra la Fig. 16, la actividad tRNA metiltransferásica declinó con la edad. La metilación de tRNA E. coli disminuyó casi 100% entre los 3 y los 43 días post natales, mientras que la metilación endógena disminuyó menos de un 50% entre los 3 y los 18 días post natales. La metilación heteróloga después de los 18 días permaneció alrededor de 30 - 35 pmol de [metil-<sup>14</sup>C] incorporados/mg de proteínas/ 30 min ya sea en ausencia o presencia de espermidina.

La distribución de la metilación de tRNA E. coli obtenida en la ausencia de espermidina se muestra en la Tabla 3, a la vez que se compara con las distribuciones obtenidas cuando se usaron enzimas de hígado de rata o de células de tumor ascítico (58, 138). Recientemente, Trottier (177) encontró patrones de metilación en tRNA E. coli K<sub>12</sub> similares a los nuestros cuando utilizó cerebro de ratón como fuente de las tRNA metiltransferasas. En nuestro estudio, hemos encontrado las siguientes bases metiladas: N<sup>2</sup>-metil guanina N<sup>2</sup>-dimetil guanina, 1-metil adenina, 5-metil citosina, 5-metil uracilo, 2-metil adenina y 1-metil hipoxantina. La ausencia de 7-metil guanina concuerda con los resultados de Leboy y Piester (146), quienes no detectaron la presencia de esta base metilada cuando incubaron

tRNA metiltransferasas de tejido hepático con tRNA E. coli, asimismo concuerda con los resultados de Pegg (139), quien demostró que 7-metil guanina no representaba más del 4% del total de [metil- $^{14}\text{C}$ ] grupos incorporados en tRNA E. coli por medio de la enzima de hígado.

El efecto de espermidina en la metilación de tRNA E. coli puede resumirse de la siguiente manera: una disminución de la [metil- $^{14}\text{C}$ ] 1-metil adenina en la corteza total y en las neuronas y un aumento de la [metil- $^{14}\text{C}$ ] N<sup>2</sup>- metil guanina, especialmente en las neuronas (Tabla 4). Leboy y Piester (1946), observaron un efecto opuesto de la espermidina en el hígado, un aumento de dos veces la cantidad de [metil- $^{14}\text{C}$ ] 1-metil adenina y una disminución equivalente de las [metil- $^{14}\text{C}$ ] guaninas. Por su parte Pegg (139) demostró que espermidina estimula [metil- $^{14}\text{C}$ ] 1-metil adenina y N<sup>2</sup>- metil guanina en el hígado. Más aún, la Tabla 4 muestra que en ausencia de espermidina la contribución neuronal [metil- $^{14}\text{C}$ ] 1-metil adenina fue dos veces mayor que la de las metil- $^{14}\text{C}$  guaninas. Este resultado sugiere un enriquecimiento en la distribución de 1-metil adenina residuo específico tRNA metiltransferasa en el compartimento neuronal (64, 178, 179).

## 2.5 RESUMEN

Por medio de la utilización de S-adenosil-L- [metil- $^{14}\text{C}$ ] metionina, se determinó la actividad metiltransferasa en corteza cerebral de rata durante la etapa post natal temprana en ausencia de tRNA exógeno (E. coli) y asimismo, se determinó la composición de las [metil- $^{14}\text{C}$ ] bases en tRNA. Se detectó la inhibición total de la formación de [metil- $^{14}\text{C}$ ] tRNA (metilación homóloga de tRNA) en presencia de 2,5 mM espermidina, mientras que la metilación de tRNA E. coli (metilación heteróloga) resultó estimulada. Hemos detectado la formación de [metil- $^{14}\text{C}$ ] 1-metil guanina y [metil- $^{14}\text{C}$ ]  $\text{N}^2$ -metil guanina después de la metilación homóloga, asimismo se encontró un cambio inverso en las proporciones relativas de estas bases metiladas durante el desarrollo.

De manera adicional, la metilación heteróloga de tRNA resultó en la formación de las siguientes [metil- $^{14}\text{C}$ ] bases:  $\text{N}^2$ -dimetil guanina, 5-metil citosina, 1-metil adenina, 5-metil uracilo, 2-metil adenina y 1-metil hipoxantina. Una comparación de la metilación heteróloga obtenida utilizando corteza total de cerebro (contiene células gliales y neuronales) y células neuronales aisladas demostró que las neuronas contienen una menor proporción de [metil- $^{14}\text{C}$ ]  $\text{N}^2$ -

metil y N<sub>2</sub>-dimetil guanina y mayores cantidades de [metil-<sup>14</sup>C] 1-metil adenina.

Los resultados encontrados sugieren:

- 1) que la metilación homóloga de tRNA permite a las células nerviosas durante el desarrollo un cambio continuo en la distribución de las poblaciones de tRNA y,
- 2) que las células neuronales poseen una cantidad relativamente más alta de adenina residuo específico tRNA metiltransferasa, la cual es muy sensible a espermidina.

### 3. SEPARACION DE BASES METILADAS CONSTITUYENTES DEL tRNA POR MEDIO DE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PERFORMANCE

#### 3.1 INTRODUCCION

Uno de los mayores problemas para determinar la naturaleza de las [metil-<sup>14</sup>C] bases componentes del tRNA, ha sido la carencia de una técnica rápida y cuantitativa para su determinación. Por ejemplo, la cuantificación de las bases metiladas requiere en general una cromatografía en capa fina bidimensional, seguido por autoradiografía, raspado de la placa y cuantificación de la radioactividad una vez eluida del residuo de la placa, lo cual representa un período de entre 15 y 25 días.

Técnicas para la detección de bases metiladas han sido vastamente estudiadas; entre ellas destacamos cromatografía de papel (180); resonancia magnético nuclear (181), cromatografía líquido gaseosa (183) y cromatografía líquida de alta performance (HPLC) (184, 195). Los trabajos recientes de Flaking y colaboradores (184) y Sen y Ghosh (185),

muestran las ventajas del tiempo y resolución obtenidas a través del empleo de HPLC. Sin embargo, las condiciones rígidas de tampones y cambios específicos de temperatura, han hecho estos métodos impopulares para la determinación rápida y rutinaria de las bases metiladas constituyentes del tRNA.

La significación biológica y la función de las bases metiladas a nivel de los polinucleótidos es desconocida. Se ha demostrado un aumento de la actividad tRNA metiltransferasa en una variedad de sistemas tumorigénicos como ha sido demostrado por Borek (186). También resultados donde se muestra un aumento de la excreción urinaria de algunos componentes de los ácidos nucleicos metilados se ha visto en pacientes que sufren de cáncer (187), lo cual sería una indicación del aumento en la metilación del tRNA por lo menos algunos tipos de cáncer.

Sin embargo, otros estudios (188), han mostrado muy poca diferencia en el contenido de las bases metiladas pertenecientes a tRNA normales y tumorigénicos. Análisis más detallado son indispensables, especialmente de las especies isoceptoras de tRNAs, ya que pequeñas variaciones que afecten isoceptores específicos no podrán ser detectadas en una población total de tRNA.

En esta sección describimos un método rápido y reproducible para la cuantificación y detección de las bases metiladas constituyentes del tRNA, este método no requiere tampones especiales o sofisticados controles de temperatura.

### 3.2 METODOS

#### Hidrólisis de [metil-<sup>14</sup>C] tRNA

El procedimiento ha sido descrito anteriormente en la Sección 2.2

#### Aparato

$\mu$ Bondapak/C<sub>18</sub>, un material no polar compuesto de una capa monomolecular de octadeciltriclorosilano disponible en forma comercial (Waters Assoc., Milford, Mass.); dicho material se utilizó como soporte para una columna cromatográfica de fase reversa (30 x 0,4 cm D.I.).

El sistema de distribución del solvente estaba equipado con una bomba de pistón doble (modelo 6000 A), un inyector líquido del tipo universal (modelo U6 K) y un detector de absorbancia (modelo 440), todos ellos pertenecientes a Waters Assoc.

El cromatograma fue registrado en un sistema de registro Omniscrite (Texas Instrument, Austin, Texas, USA).

#### Análisis cromatográfico de [metil-<sup>14</sup>C] bases

El hidrolizado de tRNA que contenía entre 2000- 8000 dpm fue disuelto en agua (0,03 - 0,02 ml), filtrado y aplicado a la columna por un orificio del inyector a la temperatura ambiente, usando para ello una microjeringa de 100  $\mu$ l (Precisión Sampling, Baton Rouge, LA) (189).

Una vez que la muestra fue inyectada en la columna, el flujo de la columna se mantuvo constante a una velocidad de 2 ml/min. Para llevar a cabo la separación de 12 bases metiladas el cambio de la solución tampón se llevó a cabo 400 segundos después de la inyección de la muestra (189).

Fracciones de 0,2 ml fueron recogidas en mini-vials y después de agregar 4 ml de PCS, una mezcla de centelleo para disolver muestras acuosas (Amersham-Scarle, Arlington Heights, IL). La radioactividad se midió en las muestras por medio de un contador de centelleo.

Todas las soluciones tampones y las muestras se filtraron a través de miliporo (0,45  $\mu$  diámetro de poro) y el gas contenido en las soluciones eliminado por medio de una bomba de vacío.

El pico más alto en la Fig. 24-29 y 32, corresponde al máximo de absorción, el cual determinado por la sensibilidad previamente asignada al instrumento, se detalla en las leyendas correspondiente a cada experimento.

### 3.3 RESULTADOS

Las condiciones óptimas para la separación cromatográfica de las bases metiladas constituyentes del tRNA en una columna  $\mu$ Bondapak/C18 han sido estudiadas.

Hemos estudiado asimismo, diversos factores que pueden afectar esta separación; la Fig. 23 muestra el efecto de la velocidad de flujo utilizada en la elución de la muestra y su efecto en la separación de dos bases metiladas, 1-metil adenina y 5-metil citosina. Se puede concluir que por lo tanto, utilizando un flujo entre 0,5 y 2,5 ml/min no hay diferencias observables en la distribución de las bases metiladas.

Una herramienta importante para la separación de compuestos en la cromatografía líquida de alta performance consiste en el reciclaje de la muestra a través de la columna, una vez que ésta ha sido eluída de la misma. Sin embargo, su aplicación se limita a aquellas muestras formadas por pocos constituyentes. La Fig. 24 muestra como el reciclaje de una muestra puede afectar en forma adversa la separación de dos bases metiladas; 1-metil adenina y 5-metil citosina. En este caso particular, la resolución de las dos bases disminuye con el reciclaje.

Cuando se compara el efecto de la fuerza iónica del buffer de elución en la separación de bases metiladas, hemos

101 a

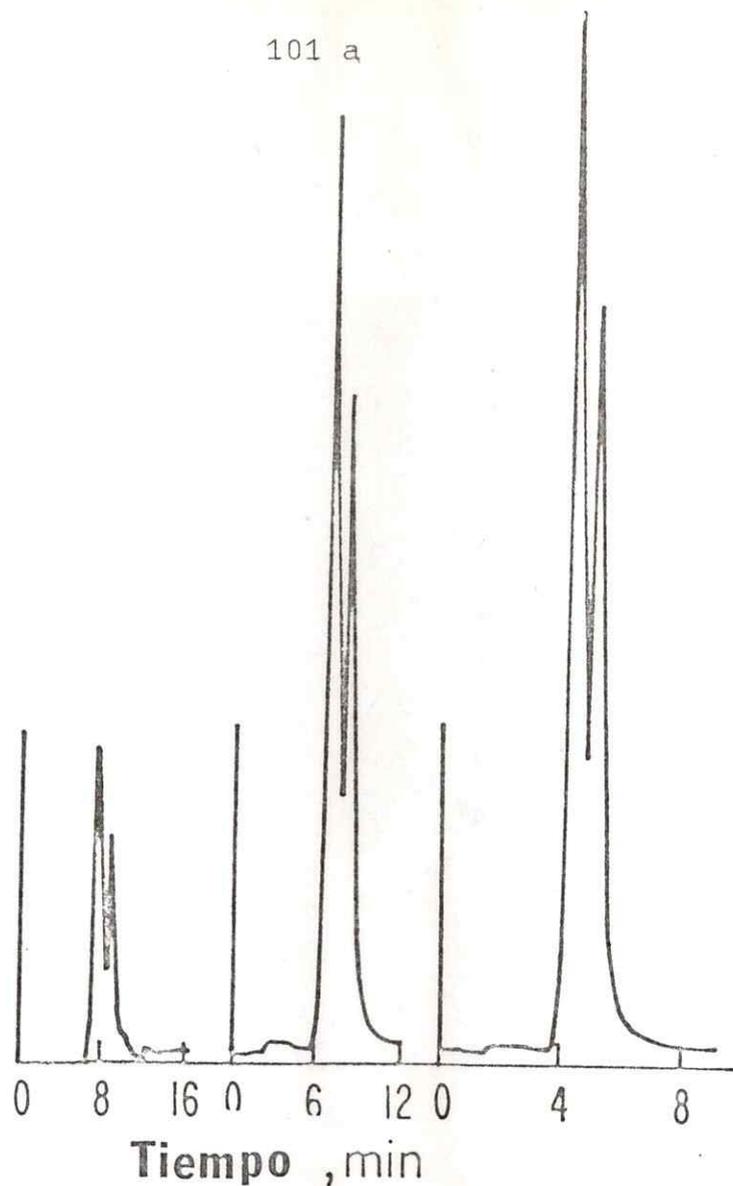


Figura 23. Efecto de la velocidad de flujo en la separación de 1-metiladenina y 5-metil citosina por  $\mu$ Bondapak/ $C_{18}$ . El detector -uv (254-nm) se ajustó a 0,1 unidades de absorción total y la velocidad de flujo a 0,5 ml/min en A; 0,05 unidades de absorciones totales y 1,5 ml/min, en B y 0,05 unidades de absorción totales y 2,4 ml/min en C. Tampón: 0,05 M amonio fosfato (pH 5,9).

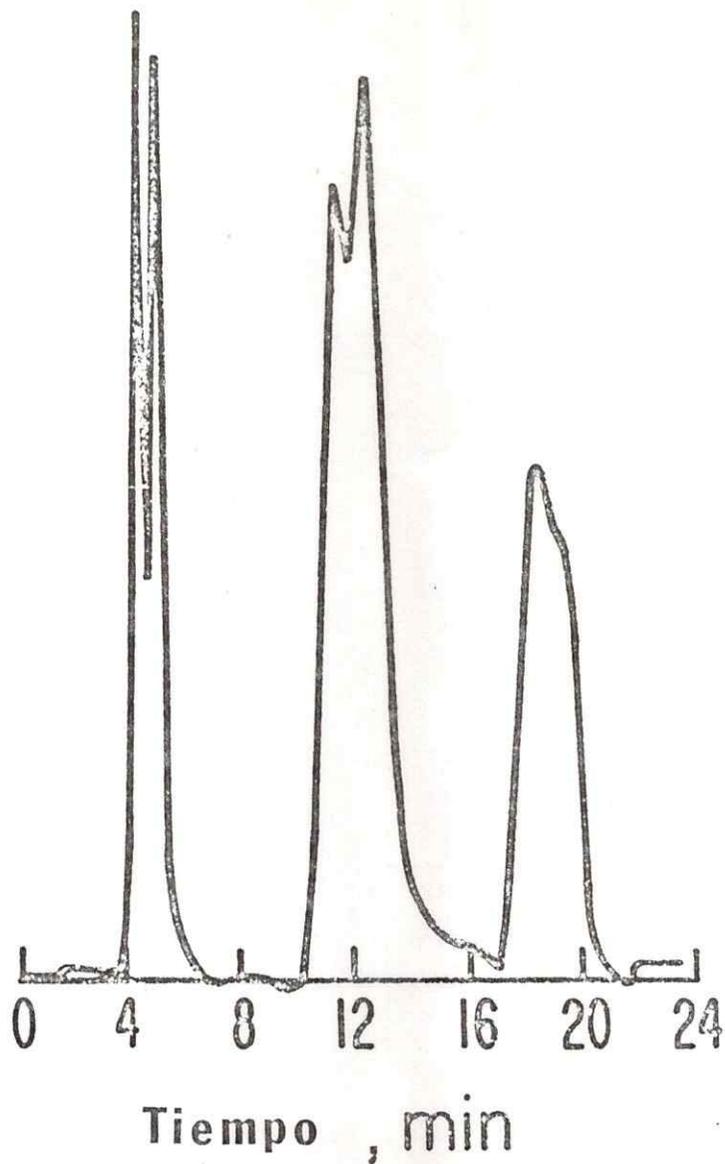


Figura 24. Reciclaje de una mezcla que contiene 1-metil adenina y 5-metil citosina. Las condiciones experimentales fueron: tampón 0,05 M amonio fosfato (pH 5,9); el detector -uv se ajustó a 0,1 unidades de absorción total y la velocidad de flujo fue 2,0 ml/min.

encontrado que la máxima resolución se produjo con un buffer 0,05 M sulfato monobásico de amonio. El pH en la solución tampón también tiene un efecto en el tiempo de retención de la muestra. Así, un sistema tampón que contiene 0,05 M amonio fosfato, pH 5,9 fue el pH óptimo para resolver una mezcla de cinco bases metiladas.

La Fig. 25 esquematiza la separación de 1-metil uracilo y 1-metil hipoxantina, utilizando 0,05 M amonio fosfato, pH 5,0 como también de elución.

La adición de tetrabutilamonio fosfato a la solución 0,05 M amonio fosfato, pH 5,9 produjo una mejor separación de 1-metil adenina de la 5-metil citosina y de la 1-metil guanina; sin embargo, bajo estas condiciones 5-metil uracilo no fue separado de 1-metil hipoxantina (Fig. 26). La adición de metanol (5-20% v/v) a la solución tampón, redujo los tiempos de retención para la mayoría de las bases metiladas.

el segundo grupo de bases metiladas fue resuelto por medio de una solución tampón 0,05 M amonio fosfato, pH 3,3. Las bases metiladas en el orden de elución fueron las siguientes: 7-metil guanina, N<sup>2</sup>-metil guanina, 2-metil adenina, N<sup>2</sup>-dimetil guanina (Fig. 27). Aunque no se muestra en la Fig. 27, N<sup>6</sup>-metil adenina y N<sup>6</sup>-demetil adenina puede resolverse también con este sistema tampón (Tabla 5). Sin embargo, ninguna de las soluciones tampones en forma separada (pH 3,3 ó 5,9)

fue capaz de resolver la mezcla completa de bases metiladas.

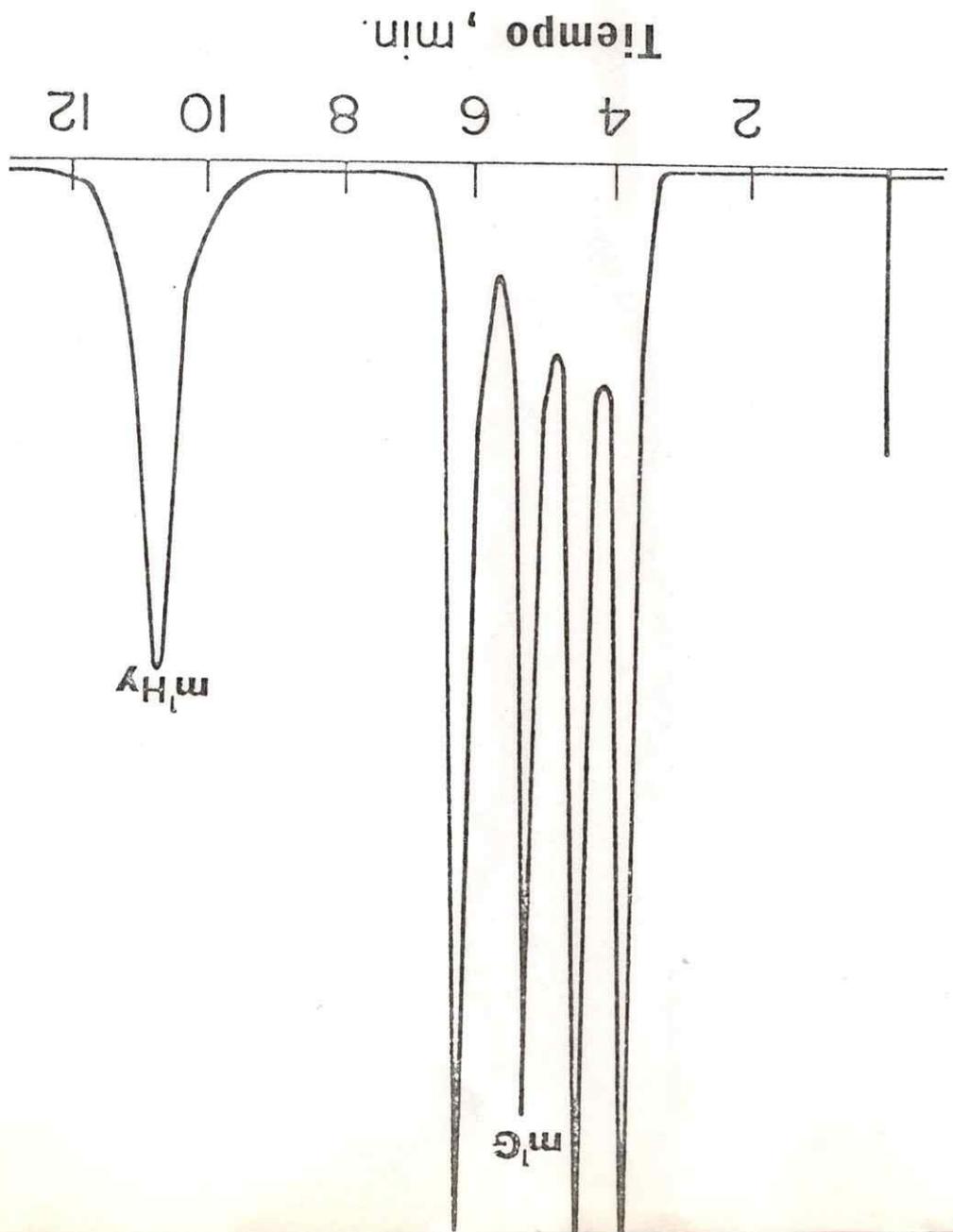
La Fig. 28 muestra la separación de la mezcla artificial de bases no modificadas constituyentes del tRNA, utilizando para ello 0,05 M sulfato monobásico de amonio, pH 5,0. Dos de estas bases, citosina y uracilo, poseen los menores tiempos de retención de todas las bases cromatografiadas (Tabla 5), en tanto que guanina eluye junto a 1-metil guanina. El tiempo de retención para adenina, fue un poco menor o a veces coincidió con el de 7-metil guanina, dependiendo del tiempo escogido para el cambio de buffer de pH 5,9 a pH 3,3.

Las condiciones óptimas para la separación de una mezcla artificial de once bases metiladas, se llevó a cabo por una combinación de las dos soluciones tampones de elución descritas anteriormente. Fig. 29 y Tabla 5, muestran los tiempos de retención de las once bases metiladas si ellas se separan bajo estas condiciones.

En este estudio hemos determinado también la linealidad de la respuesta espectrofotométrica en un rango de concentración de bases metiladas. Esto nos permitió determinar en cada caso la cantidad real de cada base o base metilada existente en las muestras; además, nos permitió corroborar que bajo nuestras condiciones experimentales la columna no fue sobrecargada (Fig. 30).

Cantidades del orden de 200 pmoles fueron fácilmente detectadas espectrofotométricamente por medio de esta técnica.

Figura 25. Separación de una mezcla artificial de 1-metil adenina, 5-metil citosina, 1-metil guanina, 5-metil uracilo y 1-metil hipoxantina por Bondapak/C<sub>18</sub>. Las condiciones experimentales fueron las mismas descritas en la leyenda de la Figura 28.



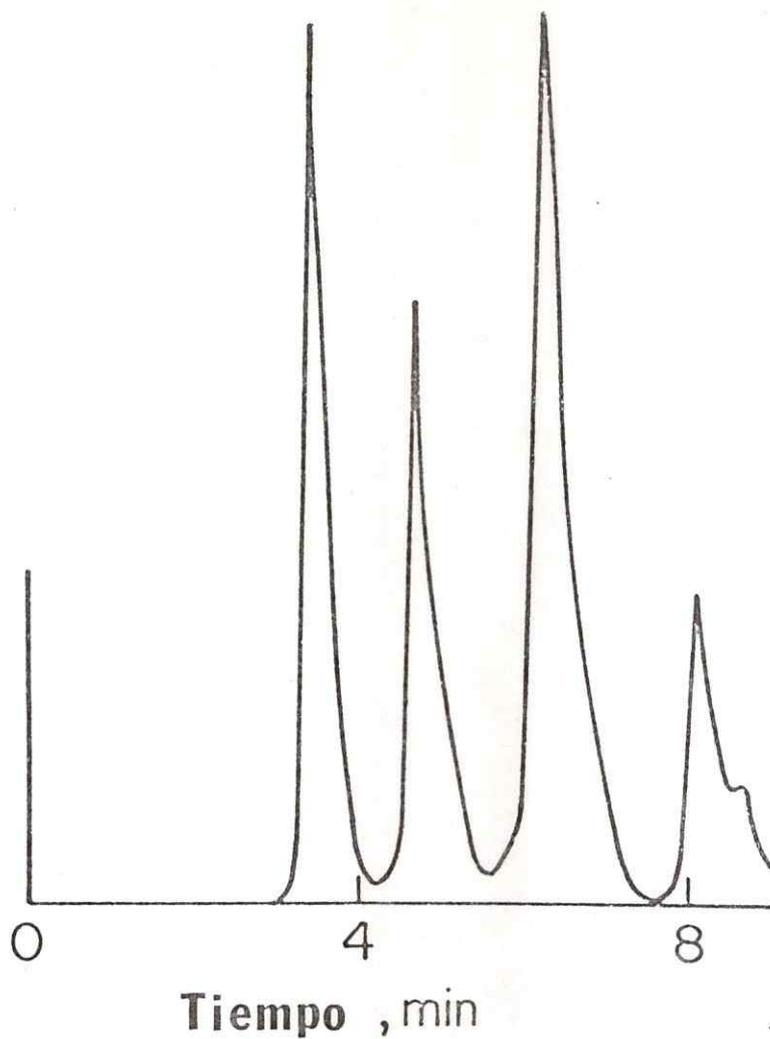


Figura 26. Efecto del tetrabutyl amonio fosfato (0,005 M) en la separación de una mezcla de bases metiladas que contienen 1-metil adenina, 5-metil citosina, 1-metil guanina, 5-metil uracilo y 1-metil hipoxantina. Las condiciones experimentales fueron las mismas que se utilizaron en la Figura 28.

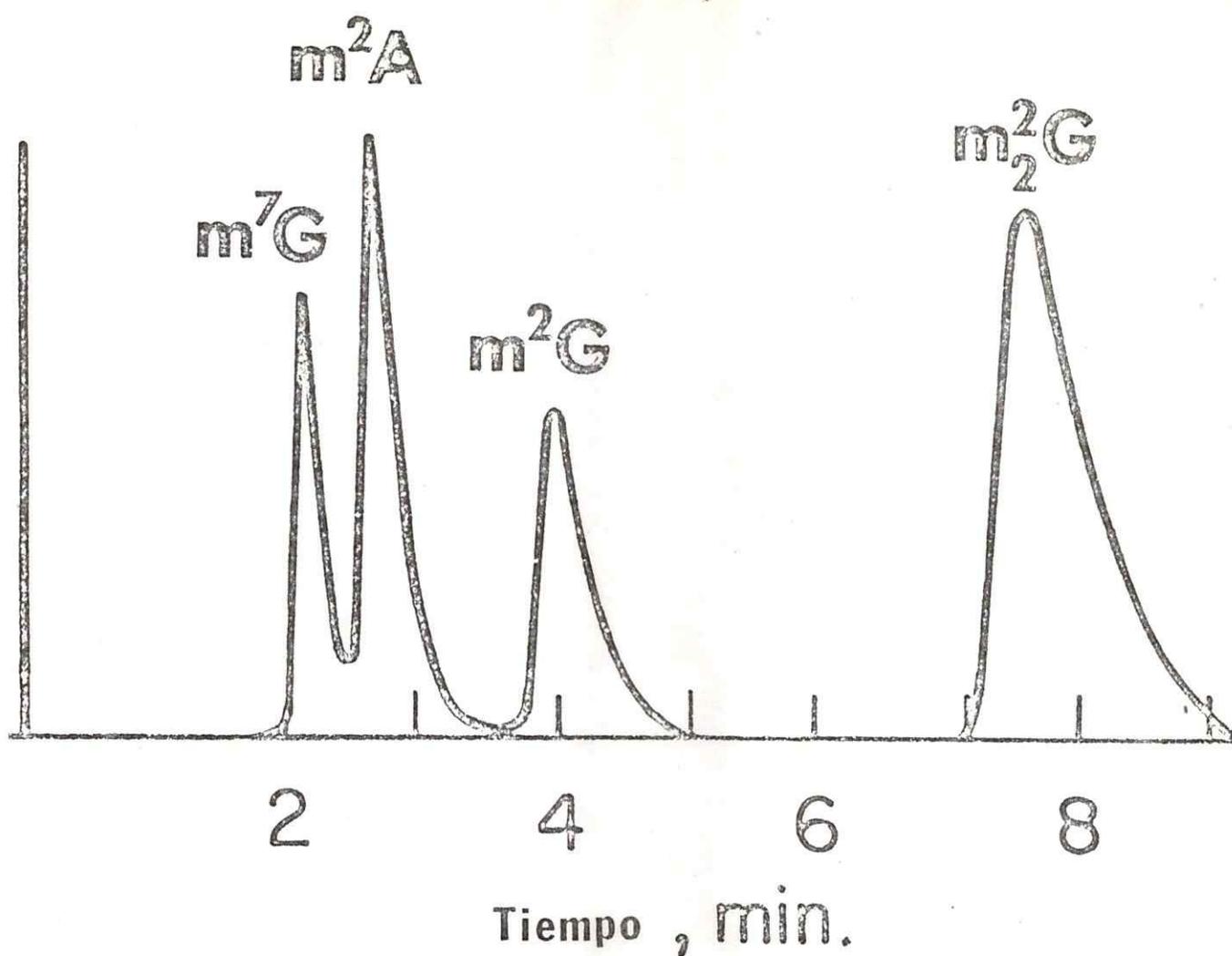


Figura 27. Separación de una mezcla artificial de 2-metil adenina, 7-metil guanina,  $N^2$ -metil guanina y  $N^2_2$ -dimetil guanina por  $\mu$ Bondapak/ $C_{18}$ . Las condiciones experimentales fueron las mismas descritas en la leyenda de la Figura 28.

Tabla 5. Separación de bases metiladas por HPLC en  $\mu$ Bondapak/ $C_{18}$ .

Base metilada	Tiempo de retención (seg)	Volúmen de retención (ml)
1-metil adenina	221	7.4
5-metil citosina	264	8.8
1-metil guanina	306	10.2
5-metil uracilo	359	12.0
1-metil hipoxantina	630	21.0
7-metil guanina	684	22.8
N <sup>2</sup> -metil guanina	767	25.6
2-metil adenina	816	27.2
N <sub>2</sub> <sup>2</sup> -dimetil guanina	1327	44.4
N <sup>6</sup> -metil adenina	963	32.1
N <sub>6</sub> <sup>6</sup> -dimetil adenina	1683	56.1
citosina	144	4.8
uracilo	174	5.8
guanina	306	10.2
adenina	718	23.9

La valoración del tiempo de retención corresponde a un promedio de tres determinaciones con menos de un 5% variación.

El volúmen de retención que se determinó a partir de los tiempos de retención a una velocidad de flujo de 2 ml/min.

Las condiciones experimentales son similares a las descritas en la leyenda de la Figura 29.

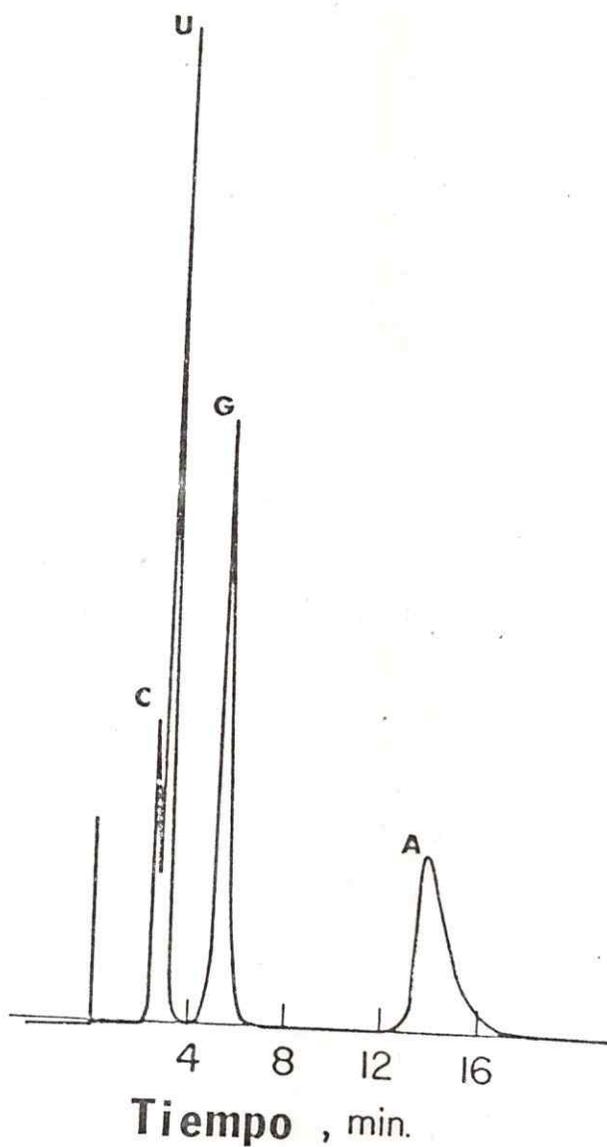


Figura 28. Separación de una mezcla artificial de citosina, uracilo, guanina y adenina por  $\mu$ Bonda - pak/ $C_{18}$  con una velocidad de flujo de 2,0 ml/min y una presión de 2,000 p.s.i. Tampón 0,05 M amonio fosfato (pH 5,9). El detector -uv (254-nm) se ajustó a 0,2 unidades de absorción total.

Finalmente, el procedimiento se utilizó para analizar la distribución de [metil- $^{14}\text{C}$ ] bases pertenecientes a E. coli tRNA las cuales fueron metiladas in vitro por una preparación parcialmente purificada de tRNA metiltransferasas provenientes de corteza cerebral de rata de 8 días (Fig. 31 y 32).

La Fig. 31 muestra los perfiles de absorción (254 nm) provenientes de los eluidos de una columna  $\mu\text{Bondapak}/\text{C}_{18}$ , la cual a sido cargada con una mezcla standard de bases metiladas que contenía además, un hidrolizado de tRNA proveniente de E. coli previamente metilado in vitro.

El perfil radioactivo (Fig. 32), indica que 1-metil adenina,  $\text{N}^2$ -metil guanina y  $\text{N}_2^2$ -dimetil guanina son las [metil- $^{14}\text{C}$ ] bases que se forman durante la reacción enzimática.

La Fig. 31 y 32 también muestran la presencia de una substancia de naturaleza desconocida que absorbe a 254 nm, la cual no es radioactiva y que posee un tiempo de retención entre 180 - 200 seg. Pseudouridina e isopenteniladenina poseen tiempos de retención semejantes a uracilo, por lo que ninguna de estas bases puede atribuirse al peak de absorción de naturaleza desconocida.

### 3.4 DISCUSION

Hemos diseñado con éxito una técnica rápida y fácilmente reproducible para la separación de once bases metiladas por medio de cromatografía de fase reversa de alta performance. Los cambios de soluciones tampones y las recolecciones de muestras pueden ajustarse para que ellas ocurran a intervalos predeterminados, siguiendo a la inyección de la muestra, gracias a que la distribución de la elución de las bases metiladas se puede definir en forma precisa en función del tiempo. El procedimiento así descrito permite la separación de la mezcla de bases metiladas en menos de 40 min.

Las columnas de  $\mu$ Bondapak/C<sub>18</sub> han sido utilizadas durante varios meses sin cambios notables en su resolución. Hay que agregar que la técnica descrita no requiere controles de temperatura estrictos, ya que ella se llevó a cabo a la temperatura ambiente. La técnica demostró ser muy aconsejable para estudiar la distribución de las [metil-<sup>14</sup>C]bases pertenecientes a tRNA metilado in vitro en presencia de tRNA metiltransferasas heterólogas.

Las condiciones óptimas para la separación de la mezcla completa de bases metiladas, se describe en la Sección Resultados. Aunque una mejor resolución se puede lograr en esta separación en presencia de tetrabutil amonio fosfato.

El procedimiento permite también la cuantificación de las bases separadas hasta un nivel de 200 pmoles, ya que el análisis espectrofotométrico asegura la proporcionalidad entre la amplitud del peak (o el área) y la cantidad de bases metiladas presentes.

Finalmente, la técnica ha demostrado ser cuantitativa en términos de la recuperación de las bases en las fracciones eluidas en comparación con la cantidad inyectada en la columna.

### 3.5 RESUMEN

Hemos separado exitosamente por medio de una cromatografía líquida de alta performance las bases purínicas, pirimidínicas y asimismo, las bases metiladas componentes del tRNA, una vez que el tRNA ha sido sometido a hidrólisis.

La separación se llevó a cabo a temperatura ambiente, por medio de la elución de los hidrolizados a través de una columna cromatográfica de fase reversa ( $\mu$ Bondapak/C<sub>18</sub>). El procedimiento permite la cuantificación de las bases hasta un nivel de 200 pmoles.

Gracias a la sensibilidad del detector ultravioleta (modelo 440).

#### 4. METILACION DE tRNA E. coli POR MEDIO DE LA tRNA ADENINA-1-METILTRANSFERASA DE CORTEZA CEREBRAL TOTAL Y DE CELULAS NEURONALES

##### 4.1 INTRODUCCION

tRNA adenina-1-metiltransferasa (tRNA-AMT) es una enzima o un grupo de enzimas semejantes que metila la posición 1 de adenina, en aquellos residuos adenílicos pertenecientes a la cadena polinucleotídica del tRNA. A diferencia de la enzima tRNA adenina-1-metiltransferasa encontrada en la fracción nuclear del dinoflagelado, Cryptocodinium Cohnii (190) que parece no poseer especificidad respecto del sustrato metilado, nuestra tRNA-AMT parece reconocer secuencias específicas dentro de la molécula de tRNA para insertar el grupo metilo (178).

En los últimos años, muchos intentos se han llevado a cabo para purificar esta enzima a partir de material biológico de distintas fuentes (por ejemplo: hígado de rata, células Hela y células procarióticas) (64, 65, 179, 191, 192). La actividad de esta enzima se ve afectada por poliaminas, cationes bivalentes, acetato de amonio, S-adenosil metionina, S-adenosil homocisteína (75, 139, 193, 194, 195). Los iones

y las poliaminas interactúan de una manera directa con el tRNA y/o con las tRNA metiltransferasas. La unión del tRNA con las poliaminas produce un efecto estabilizador en la cadena polinucleotídica, de una manera similar ión magnesio estabiliza la estructura terciaria del tRNA (145). Surge la posibilidad entonces, que las poliaminas y magnesio activan la reacción de metilación al unirse al tRNA y abrir de esta manera a los sitios de metilación a las tRNA metiltransferasas. Algunas observaciones pueden citarse para apoyar esta hipótesis. El efecto estimulador de las poliaminas depende del tipo de tRNA usado como sustrato (196) y la concentración óptima estimuladora para una poliamina depende de la concentración de tRNA (139). Aunque estos y otros resultados sugieren un rol de los cationes y las poliaminas a nivel de tRNA un efecto directo sobre las tRNA metiltransferasas no puede ser descartado a la fecha.

Como se muestra en la Tabla 4, hemos detectado una disminución relativa en la metilación de residuos adenina pertenecientes a tRNA E coli total si 2,5 mM espermidina estaba presente en la mezcla de incubación que contenía una preparación enzimática cruda derivada de corteza cerebral de rata (157).

En esa oportunidad se sugirieron dos posibilidades para explicar los resultados observados:

- a) Espermidina inhibe la metilación de los residuos adenina en posición 1; o
- b) la metilación de todas las bases susceptibles de ser metiladas es proporcionalmente mayor que la metilación de adenina en posición 1, y esto se refleja en una disminución aparente del porcentaje de 1-metil adenina formada.

En la Tabla 4 (157) también se señala un relativo enriquecimiento en la actividad tRNA-AMT de extractos derivados de células nerviosas previamente aisladas (156), comparado con preparaciones similares obtenidas a partir de corteza cerebral (neuronas + células gliales). Para aclarar algunos de estos resultados, hemos decidido estudiar la localización celular de la enzima tRNA-AMT para luego comparar las propiedades de la enzima parcialmente purificada a partir de corteza cerebral de rata y células nerviosas aisladas de corteza cerebral

## 4.2 METODOS

Hidrólisis de [metil-<sup>14</sup>C] tRNA

Acido trifluoroacético (1 ml) se mezcló con [metil-<sup>14</sup>C] tRNA en un tubo de combustión (25 x 2 I.D. cm)(A.H. Thomas Co., Philadelphia, PA) sellado bajo vacío e incubado a 170°C durante 30 minutos. Después de la hidrólisis el ácido trifluoroacético se evaporó con una corriente de nitrógeno a la temperatura ambiente y el residuo seco se conservó a 4°C.

Análisis Cromatográfico

El hidrolizado de tRNA (157) que contenía entre 2.000 y 10.000 dpm se disolvió en agua (0,2 ml) y fue aplicado a la columna a través de la cavidad del inyector a la temperatura ambiente usando una jeringa de 100 µl (Precision Sampling Corp., Baton Rouge, LA). Después de la inyección de la muestra, el flujo de la columna se mantuvo a 2 ml por minuto. Para una separación óptima (189) de las [metil-<sup>14</sup>C] bases, la solución tampón fue cambiada 400 seg después de la inyección de la muestra. Fracciones (0,02 - 0,1 ml) se colectaron en minutubos plásticos de centelleo (Rochester

Scientific Co., Inc., Rochester, NY) a las que se les agregó 2 ml de mezcla de centelleo ACS (Amersham, Searle, Arlington Heights, IL).. La radioactividad de la muestra se determinó en un contador de centelleo líquido Beckman 250. Todas las muestras y las soluciones fueron filtradas a través de filtros miliporo (0,45 u diámetro de poro) y luego degaseadas por vacío.

#### Metilación de tRNA E. coli in vitro

Hemos descrito con anterioridad la composición de las mezclas para estudiar la velocidad de metilación de tRNA y la capacidad de metilación de tRNA (139) utilizando tRNA metiltransferasas de sistema nervioso (157). Para el estudio de los parámetros cinéticos y los efectos de análogos de SAH sobre la actividad enzimática, hemos utilizado la mezcla de reacción correspondiente a velocidad de metilación de tRNA.

#### Preparación de tRNA - AMT

Ratas Sprague-Dawley machos (8 días de edad) fueron decapitadas y luego se removi6 rápidamente la corteza cerebral (aproximadamente 15 gr) para proceder en seguida a la homogenización del tejido nervioso en un homogenizador

Potter-Elvehjem (vidrio-teflón). El volumen del tampón de homogenización fue 3,5 veces el peso del tejido.

La solución tampón contenía 10mM Tris-HCL, pH 7,6 , 1mM EDTA y 1 mM ditioneitol (DTT). El homogenizado se centrifugó a 165.000 x g durante 150 min y el sobrenadante obtenido fue fraccionado con una solución saturada de sulfato de amonio a la temperatura ambiente y cuyo pH se ajustó a pH 7,0 (139). El precipitado obtenido fue recuperado por centrifugación, resuspendido en una solución 10mM Tris-HCL, pH 8,0 que contenía 1 mM EDTA y 1 mM DTT (buffer A). Esta suspensión se dializó durante la noche contra 3 litros del mismo buffer. El dializado (10 ml) fue hecho 1mM Nafosfato y luego aplicado a una columna (25 x 1,5 cm) de hidroxilapatita esferoidal, la cual había sido previamente equilibrada con el mismo buffer. Una vez aplicada la muestra la columna fue lavada con el mismo tampón (tampón de equilibración) para luego eluir la muestra con un gradiente lineal de fosfato de Na (1 - 400 mM; volumen total de la gradiente 300 ml) en solución tampón A.

La actividad total metiltransferásica de el eluído, se determinó utilizando tRNA total *E. coli* como sustrato mtil acceptor. El peak 1 en la Fig. 33 fue reunido y concentrado por precipitación con sulfato de amonio sólido hasta una saturación del 80%. El precipitado fue luego recuperado por centrifugación y disuelto en 20 ml 50 mM

Tris-HCl, pH 8,0 que contenía 0,1 mM EDTA y 1 mM DTT y luego dializado durante la noche contra 2 lt del mismo buffer. El material no dializable fue aplicado al día siguiente sobre una columna (130 x 0,9 cm) Sephadex G-200, la cual fue previamente equilibrada con el mismo buffer 50 mM Tris-HCl pH 8. La actividad enzimática se eluyó de la columna con el mismo tampón y las fracciones activas fueron reunidas y concentradas por medio de una precipitación con sulfato de amonio (80% de saturación). El precipitado recuperado después de centrifugación se disolvió en una pequeña cantidad de solución tampón A y luego dividida en pequeñas alícuotas, las cuales fueron conservadas a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### tRNA - AMT preparado de cuerpos celulares neuronales

Los cuerpos celulares neuronales fueron preparados a partir de cortezas cerebrales de ratas machos de 8 días de edad, como se describió con anterioridad (156, 197), luego fueron suspendidas y homogenizadas en el mismo buffer utilizado para la preparación de cortezas totales (3,5 ml de tampón por g de pellet neuronal).

El tratamiento subsecuente de esta preparación fue idéntico al descrito para la preparación de la enzima

obtenida a partir de corteza cerebral total.

#### Determinación de proteínas

La determinación de proteínas se llevó a cabo de acuerdo al método descrito por Lowry y colaboradores (160), usando sero albúmina de bovino cristalizada como standard.

#### 4.3 RESULTADOS

Como lo muestra la Fig. 33, la cromatografía sobre hidroxilapatita esferoidal resolvió dos peaks de actividad metiltransferasa. El primer peak contenía la mayoría de la actividad tRNA - AMT, mientras que el segundo contenía tRNA - AMT más cantidades importantes de tRNA-guanina N<sup>2</sup>-metil transferasa y tRNA-guanina-N<sub>2</sub><sup>2</sup>-dimetil-transferasa. En contraste con esto, preparaciones equivalentes derivadas a partir de cuerpos celulares neuronales contenían solamente la actividad tRNA - AMT como lo indica la Fig. 24. Debe hacerse notar que los volúmenes de elución obtenidos para el primer peak en la Fig. 33 y 34, fueron idénticos, independientemente de la fuente de la enzima. Al mismo tiempo, la precipitación con amonio de sulfato y diálisis previas a la cromatografía fueron pasos necesarios para una separación exitosa de la tRNA - AMT de las otras actividades tRNA metiltransferasas.

El pico 1 (Fig. 33) fue purificado posteriormente por pasaje a través de una columna Sephadex G-200 (Fig. 35). Las fracciones eluidas que contenían tRNA - AMT fueron tratadas como se describió en la sección Métodos 4.2 y luego

utilizada para los estudios subsecuentes.

Para determinar inequívocamente la especificidad de la enzima tRNA - AMT, tRNA total *E. coli* fue metilado utilizando las preparaciones enzimáticas parcialmente purificadas obtenidas a través de las cromatografías sobre hidroxilapatita y Sephadex G-200. El [metil- $^{14}\text{C}$ ] tRNA resultante fue hidrolizado con ácido trifluoroacético a  $170^\circ$  durante 30 min y luego de la evaporación del ácido, los hidrolizados fueron sometidos a cromatografía líquida de alta performance (HPLC) como se describió en la sección Métodos 4.2 (189). El análisis radiométrico obtenido en los eluidos de la cromatografía HPLC demostró que virtualmente toda la radioactividad se encontraba en la posición correspondiente a las 1-metil adenina (Fig. 36)

Ensayos de metilación en los que se utilizó preparaciones enzimáticas de corteza cerebral, demostraron además de la existencia de [metil- $^{14}\text{C}$ ] 1-metil adenina, cantidades menores de [metil- $^{14}\text{C}$ ] 1-metil guanina y  $\text{N}^2$ -metil guanina, estas dos últimas representaban menos de un 10% del total de [metil- $^{14}\text{C}$ ] tRNA formado.

La tabla 6 resume el procedimiento de purificación de tRNA - AMT a partir de corteza cerebral.

Los efectos de  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{Mg}^+$  sobre tRNA-AMT se comparan en la Fig 37A y 37B, respectivamente. 5 mM  $\text{Mg}^+$  y alrededor de

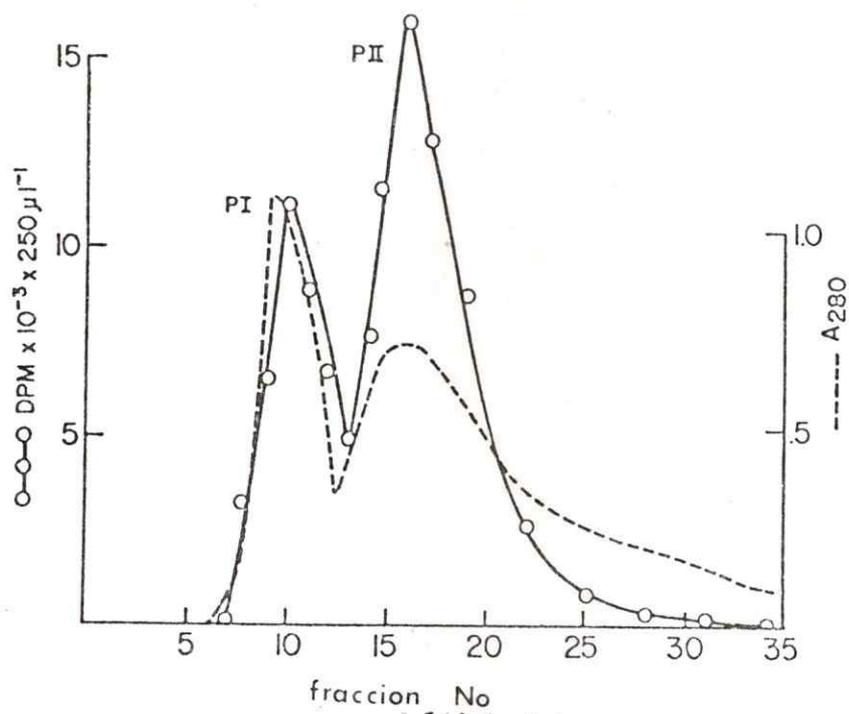


Figura 33. Cromatografía en hidroxilapatita esférica de tRNA metiltransferasas de corteza cerebral. La columna se eluyó con un gradiente lineal de fosfato (1-400 mM). Se analizaron alícuotas para estudiar la actividad de las tRNA metiltransferasas (250  $\mu$ l) en un ensayo de "velocidad". Las tRNA metiltransferasas fueron derivadas de una preparación de corteza cerebral total. Para detalles, ver Métodos Sección 4.2.

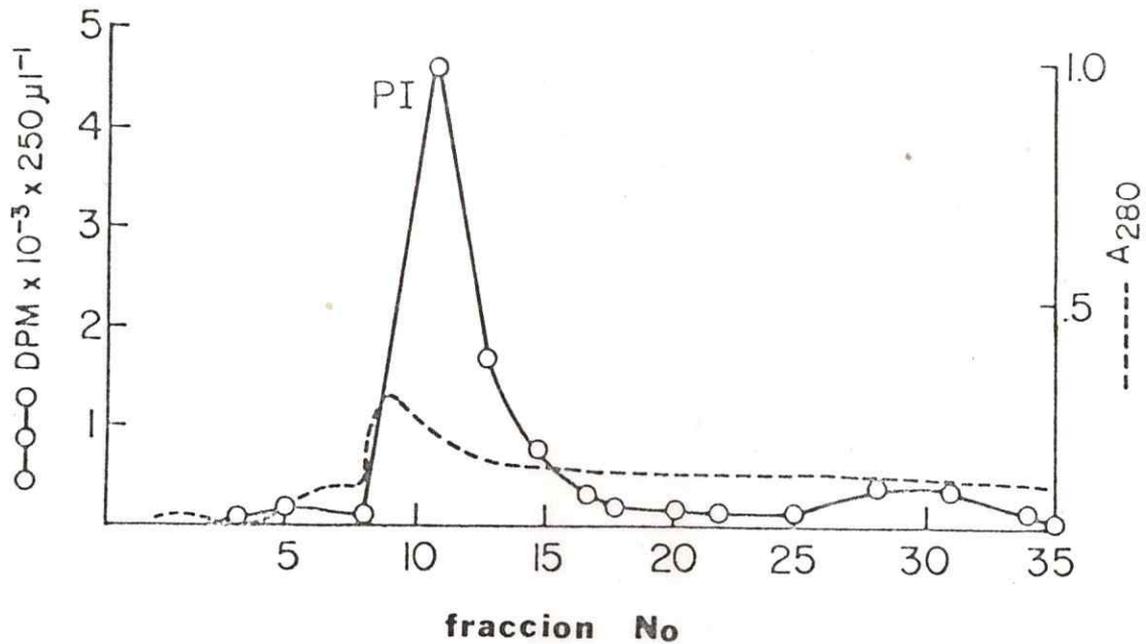


Figura 34. Cromatografía en hidroxilapatita esférica de tRNA metiltransferasas de corteza cerebral. Las condiciones experimentales fueron análogas a las descritas en la leyenda de la Figura 33. Las tRNA metiltransferasas fueron derivadas a partir de una preparación de perikaria neuronal. Para más detalles ver Métodos Sección 4.2. Se usó dpm en la ordenada en vez de actividad específica ya que no fue posible determinar con certeza el contenido proteico de los extractos neuronales debido a la presencia de una proteína extraña (ver ref. 197).

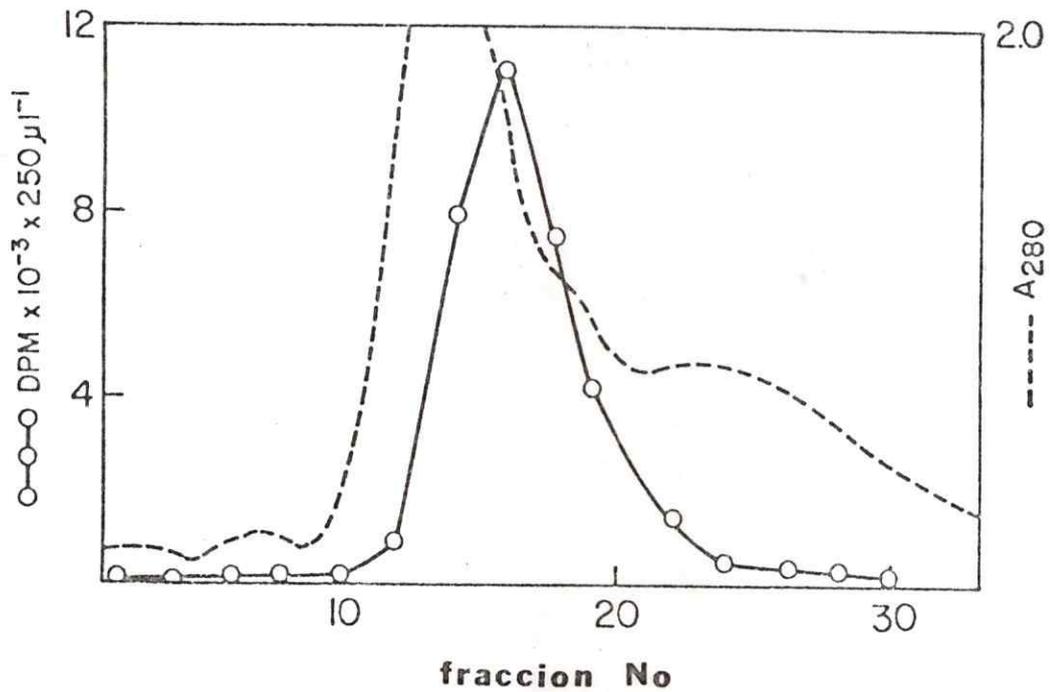


Figura 35. Cromatografía sobre Sephadex G-200 de tRNA-AMT preparada a partir de corteza cerebral de rata total. A las alícuotas se les determinó la actividad tRNA-AMT en un ensayo de velocidad. Para detalles ver Métodos Sección 4.2.

0,5 M  $\text{NH}_4^+$  fueron las concentraciones de estos cationes que produjeron una máxima estimulación de la actividad tRNA-AMT en corteza cerebral.

La Fig. 37C muestra los efectos ejercidos por el pH en la actividad cortical y neuronal de TRNA-AMT. La máxima actividad enzimática fue detectada alrededor del pH 8,2 - 8,4 para ambas preparaciones, cuando se utilizó una solución tampón 100mM Tris-HCL.

Los experimentos que se muestran a continuación corresponden a estudios en los cuales se utilizó tRNA-AMT obtenida a partir de corteza cerebral total (a menos que se especifique lo contrario); sin embargo, la enzima obtenida a partir de cuerpos celulares neuronales dio resultados análogos. La fig 38 corresponde a un estudio comparativo de los efectos de diferentes concentraciones de espermidina, espermina y putrecina en la actividad de la tRNA - AMT obtenida de corteza cerebral total.

Espermidina produjo una máxima estimulación de la actividad tRNA - AMT a concentraciones entre 2-3 mM, en forma similar a lo demostrado anteriormente con una preparación cruda de tRNA metiltransferasa de corteza cerebral (157).

Alternativamente, 1 mM espermina y 40 - 60 mM putrecina fueron las concentraciones óptimas de estas poliaminas para producir una máxima actividad tRNA - AMT. En

otro experimento (Fig. 39), se han estudiado los parámetros cinéticos pertenecientes a tRNA - AMT, encontrándose una constante  $K_m$  aparente de 6  $\mu\text{M}$  para el sustrato S-adenosil-metionina. La metilación de tRNA fue inhibida de manera competitiva por SAH con una constante de inhibición de alrededor de 16  $\mu\text{M}$ .

La tabla 7 enumera los efectos de una serie de análogos de SAH en la actividad de la tRNA - AMT neuronal. De todos los compuestos ensayados, el efecto inhibitorio más marcado se produjo por  $10^{-4}\text{M}$  S-adenosil-L-cisteína (SAC) (35%), mientras que el efecto inhibitorio más débil fue observado con  $10^{-4}\text{M}$  S-adenosil-D-homocisteína (SADH) (21%).

Una caracterización más detallada de la tRNA-AMT se llevó a cabo al utilizar especies diferentes de tRNA E. coli como sustrato. Como lo demuestra la Tabla 8, la capacidad de metilación de los diversos tRNAs E. coli varió marcadamente, siendo tRNA  $\text{glu}_2$  el mejor sustrato y tRNA el peor de ellos. Las capacidades de metilación de tRNA y tRNA val fueron equivalentes al 12% y 2% respectivamente, respecto de la metilación obtenida con tRNA  $\text{glu}_2$ , los resultados son comparables a los obtenidos utilizando la enzima obtenida a partir de hígado de rata (64, 178)

Para determinar si tRNA - AMT es una enzima localizada exclusivamente en el compartimiento neuronal del sistema nervioso, fracciones equivalentes de la enzima fueron

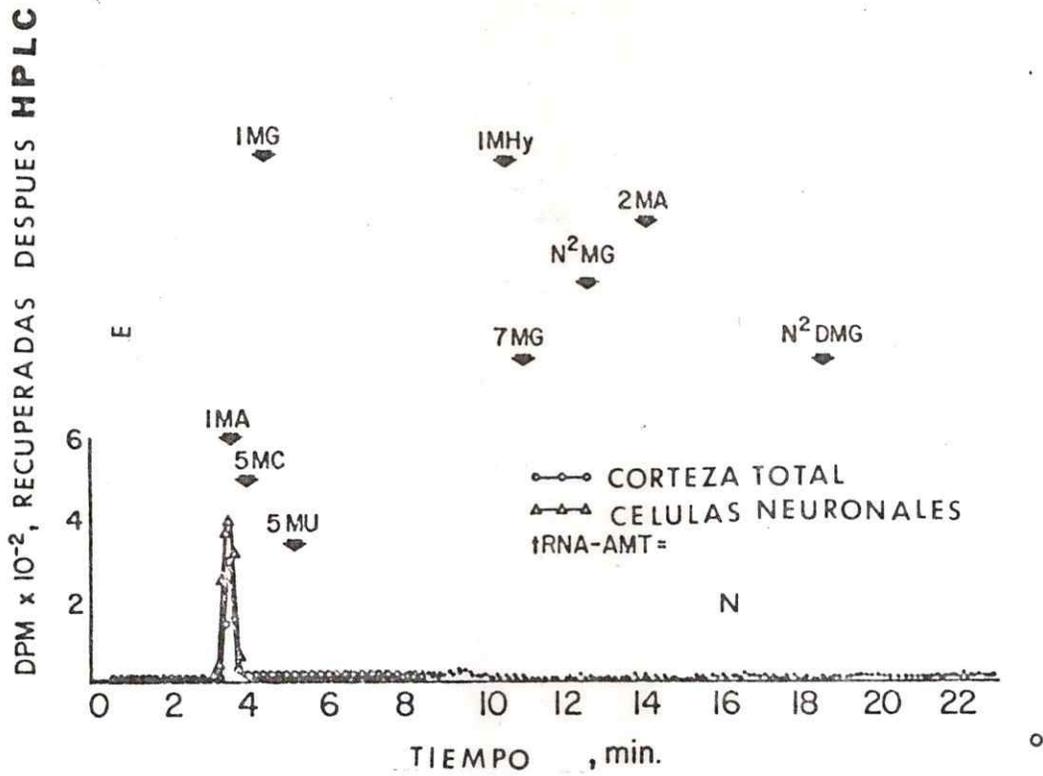


Figura 36. Cromatografía líquida de alta performance (HPLC) de un hidrolizado de tRNA de *E. coli* sobre  $\mu$ Bondapak/C<sub>18</sub>. Para detalles ver Métodos Sección 4.2.

Tabla 6. Purificación de tRNA-AMT a partir de corteza cerebral de rata.

Fracción	Vol. (ml)	Unidades* ml	Unidades totales	Prot. mg/ml	Unid/mg prot.	Rendi- miento	Purifi- cación
Homogenizado	52	61,534	$3.2 \times 10^6$	19.8	528	100	0
Sobrenadante alta velocidad	48	41,666	$2.0 \times 10^6$	6.7	1,057	62.5	1.9
Sulfato de amonio	13	99,995	$1.3 \times 10^6$	15.2	1,118	40.6	2.1
Hidroxilapa- tita	3	137,852	413,556	11.3	12,200	12.9	23.1
Sephadex G-200	5	11,360	56,800	0.27	42,074	1.8	79.7

La fuente inicial de enzima fueron 14,4 g de corteza cerebral de rata.

\* dpm [metil  $^{-14}\text{C}$ ] tRNA/30 min.

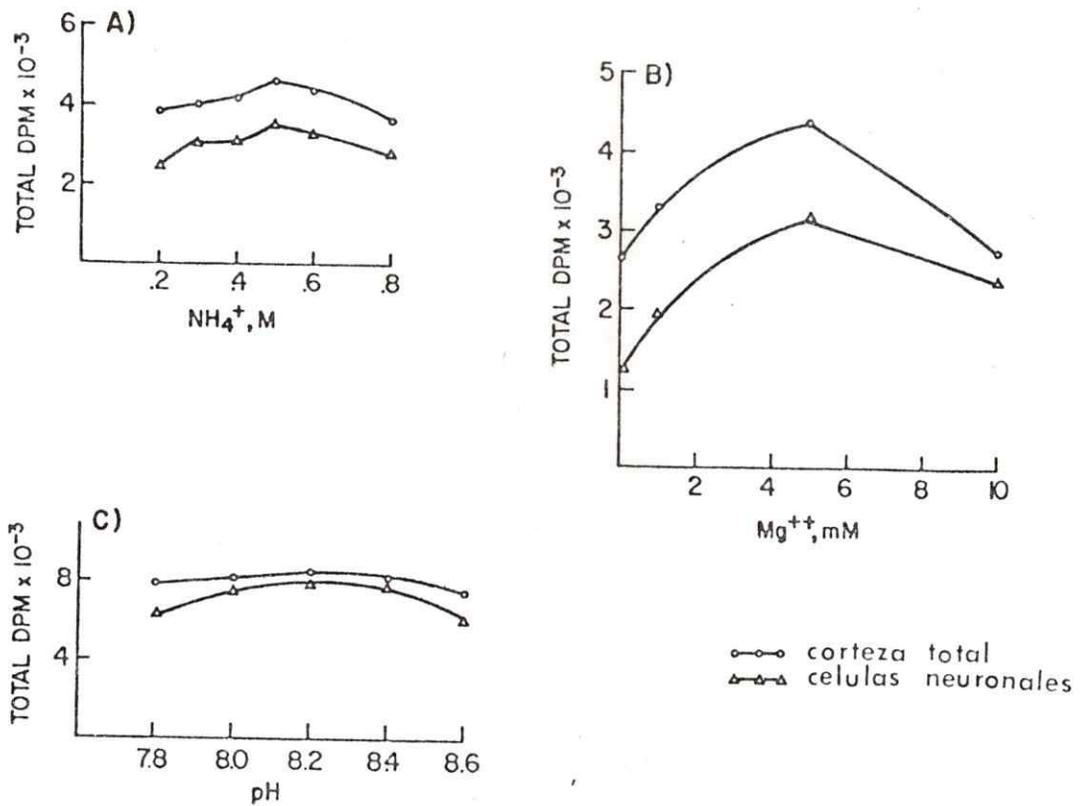


Figura 37. Efecto del  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Mg}^{++}$  y pH en la actividad de tRNA-AMT. Se utilizó el procedimiento de ensayo de "velocidad". Nótese que A) contenía solo  $\text{NH}_4$ ; B) solo Mg; mientras que C) contenía solo 2,5mM es - permidina. Las 3 mezclas de incubación contenían 100 mM Tris-HCl.

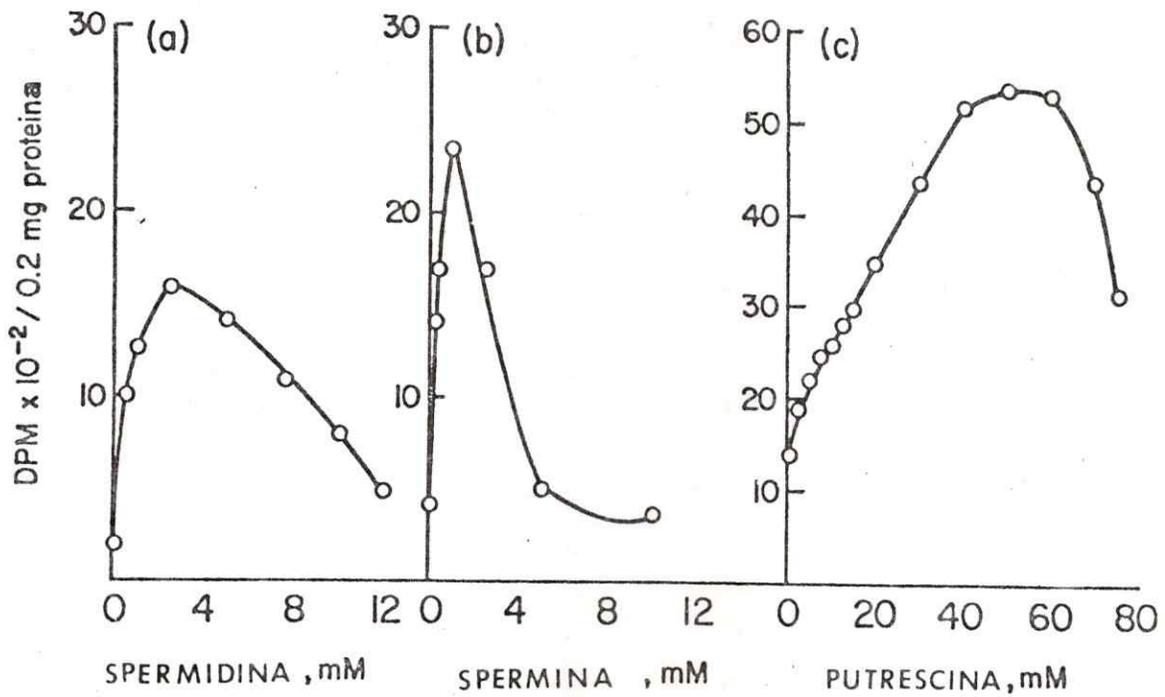


Figura 38. Efecto de las poliaminas en la actividad de tRNA-AMT usando tRNA total de *E. coli*. La actividad enzimática se midió en "velocidad" usando tRNA-AMT de corteza total.

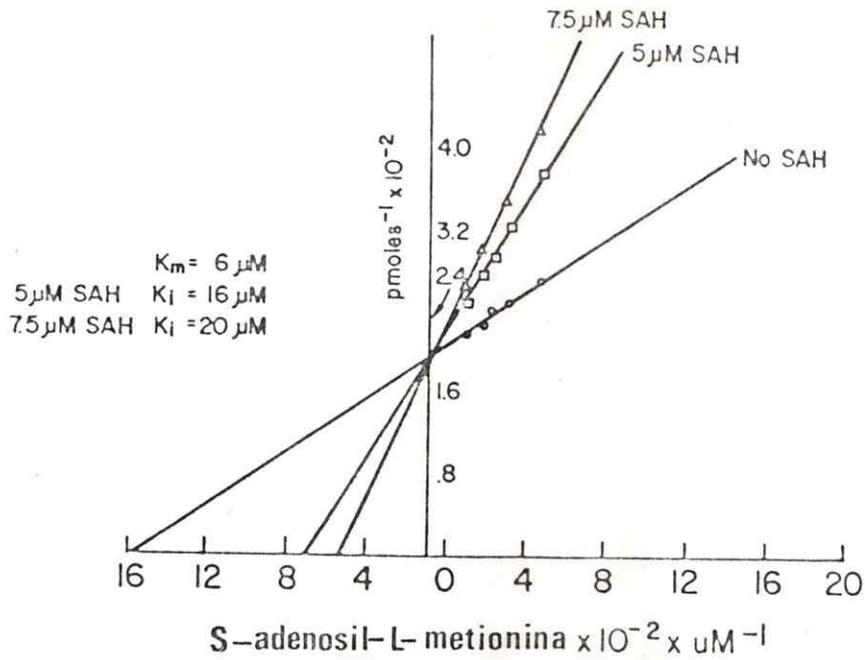


Figura 39. Curva Lineweaver y Burk de la metilación de tRNA *E. coli* usando tRNA-AMT preparado de perikaria neuronal. Se usó el procedimiento de "velocidad" y la incubación duró 20 min. SAH: S-adenosil-L-homocisteína.

preparadas a partir de corteza cerebral total, cuerpos celulares neuronales aislados, células gliales (156) y células gliales cultivadas (astrocitos), las cuales fueron derivadas a partir de corteza cerebral de rata de 3 días de edad en un cultivo primario durante 12 a 14 días (198). La Tabla 9, muestra que [metil- $^{14}\text{C}$ ] 1-metil adenina representaba 41,5% de la radioactividad total recuperada después de HPLC en las neuronas contra un 30,2% y un 28,1% en los dos tipos de células gliales analizadas con un valor intermedio de 32,1% en la corteza total. De manera inversa, la Tabla 9 muestra también que bajo las condiciones del ensayo la formación de  $\text{N}^2$ -metil guanina (189) fue significativamente más alta en las células gliales (glías aisladas 42,2% y cultivadas 34,1%), comparadas con los valores obtenidos a partir de cuerpos celulares neuronales (18,2%).

Tabla 7. La inhibición de tRNA-AMT cerebral.

Compuesto	% Inhibición		
	$10^{-4}$ M	$10^{-5}$ M	$10^{-6}$ M
S-adenosil-L-homocisteina	84	34	2.2
S-adenosil-D-homocisteina	21	12	2.2
S-adenosil-L-cisteina	35	0	0
S-5'-butil-5'-deoxiadenosina	0	0	0
S-adenosil-5'-deoxi-5'-tioetanol	0	0	0
S-5'isobutil-5'-deoxiadenosina	0	0	0
2-0-metiladenosina	0	0	0
9-β-D-arabinofuranosiladenosina	0	0	0
9-β-D-arabinofuranosilhipoxantina	0	0	0
1-β-D-arabinofuranosiluracilo	0	0	0
adenosina	11	0	0

La fuente de enzima fueron células neuronales obtenidas a partir de ratas de 8 días de edad. La enzima se incubó en presencia de tRNA *E. coli*, 2,5 mM espermidina y S-adenosil-L-[metil  $^{-14}\text{C}$ ] metionina durante 30 min. a 37°C y luego precipitada con TCA al 10%. Para más detalles ver Métodos Sección 4.2.

Tabla 8. Metilación de tRNAs individuales de E. coli.

tRNA	Actividad relativa*
tRNA total	1.00
tRNA <sup>val</sup>	0.71
tRNA <sup>phe</sup>	0.43
tRNA <sup>glu<sub>2</sub></sup>	3.57

La enzima usada fue de corteza cerebral de ratas de 8 días.

El ensayo de "capacidad" se realizó en presencia de 2.5 mM espermidina, 1 mg de proteína cerebral y tRNA entre 1.5-2.0 nmoles.

Incubación: 2 h.

\* Actividad con tRNA total:  $6.3 \times 10^4$  dpm/mg/120 min.

Tabla 9. Comparación de la capacidad de metilación en tRNA E. coli con enzimas derivadas de corteza cerebral, neuronas corticales aisladas, células gliales y células astrocíticas en cultivo.\*

[metil- <sup>14</sup> C] base	Corteza total	Aislado del total**		
		Perikaria neuronal	Células gliales	Astrocitos en cultivo***
1-metil adenina	32.1	41.5	30.2	28.1
5-metil citosina	16.8	13.7	9.6	16.7
1-metil guanina	2.4	9.0	N.D.	10.0
1-metil hipoxantina	7.7	5.7	8.2	7.4
N <sup>2</sup> -metil guanina	28.4	18.2	42.2	34.1
N <sub>2</sub> <sup>2</sup> -dimetil guanina	9.5	9.9	9.8	trace
Bases menores	3.1	2.0	N.D.	3.7
Radiactividad total (dpm)	11,143	12,713	1,476	9,848

\* Los valores se expresan como porcentaje de la radioactividad total recuperada después de HPLC.

\*\* Por el procedimiento de Sellinger y cols., (156).

\*\*\* Por el procedimiento de Cummins y Glover (198).

Ensayo de "capacidad", Incubación 2 h; espermidina 2,5 mM, tRNA E. coli (10 ug).

## 4.4. DISCUSION

Hemos descrito en esta sección un proceso de purificación que produce tRNA - AMT 80 veces purificada, a partir de corteza cerebral de ratas de 8 días; la enzima bajo estas circunstancias se encuentra libre de contaminación debido a la guanina-tRNA metiltransferasa. El procedimiento descrito requiere cantidades relativamente pequeñas de tejido (15 g). Vale la pena destacar que al purificar la misma enzima a partir de otros tejidos, hígado de rata (64) y células Hela (179), se lograron purificaciones mucho mayores pero también los procedimientos fueron más elaborados, encontrándose también en estos casos una ausencia de contaminación debido a otras tRNA metiltransferasas. Aunque Kuchino Nishimura (178) no ha informado el incremento en purificación de la tRNA - AMT preparada a partir de hígado de rata, estos investigadores han demostrado que la enzima no se encuentra contaminada con otras tRNA metiltransferasas al ensayar el producto final de la preparación de tRNA - AMT. En nuestro estudio, no hemos encontrado diferencia entre la tRNA -AMT purificada a partir de la corteza cerebral y la enzima obtenida a partir de cuerpos celulares neuronales (Fig. 33- 36)

El estudio de inhibidores de la tRNA - AMT (Tabla 7), mostró que  $10^{-4}$ M SAH inhibió totalmente la actividad tRNA - AMT, en tanto que a concentraciones  $10^{-6}$ M de SAH el grado de inhibición fue mínimo (10%). Las inhibiciones producidas por  $10^{-4}$ M SADH y  $10^{-4}$ M SAC, fueron 3,5% y 21% respectivamente, mostrando así la menor efectividad de estos análogos de SAH como inhibidores de la reacción de metilación (199, 200, 201). Al comparar las inhibiciones producidas por SAC y SADH se estableció que la longitud de la cadena aminoacídica no es un factor crítico para determinar la eficacia de un inhibidor de tRNA - AMT, que por otra parte  $10^{-5}$ M SADH es ligeramente más efectivo que una concentración igual de SAC.

El resultado que se ilustra en la Fig. 37A, muestra que la concentración necesaria de  $\text{NH}_4^+$  para obtener una máxima estimulación de la tRNA - AMT cerebral (0,5 M) fue superior a la concentración determinada previamente para tejidos no neural y neural (0,1 - 0,25 M) (139, 157, 202, 203). La tRNA - AMT aislada de corteza cerebral también se diferencia de la enzima aislada a partir de hígado de rata (195), en términos de sus requerimientos de  $\text{Mg}_2^+$ , ya que en nuestro caso una actividad apreciable de la tRNA - AMT se encontró en presencia de 2 - 10 mM  $\text{Mg}_2^+$  en ausencia de poliaminas o  $\text{NH}_4^+$  (Fig. 37B), mientras que Leboy y Glick (195) han informado

una actividad tRNA - AMT despreciable en la presencia de 0,5 - 10 mM  $Mg_2^+$ . Al comparar a dpm incorporados sobre tRNA en las Figs. 37A-C, demuestra que espermidina (Fig. 37A) produce el efecto estimulador máximo sobre la metilación de tRNA.

La estimulación in vitro de las tRNA metiltransferasa por medio de espermidina, espermina y putrecina (Fig. 38) constituye un fenómeno bien establecido (139,146, 157, 194, 202, 204). Podemos constatar sin embargo, que mientras espermina estimuló las metiltransferasas de cerebro y no cerebrales, aproximadamente en un rango óptimo de 1 - 1,5 mM (139, 194, 202, 205), las otras poliaminas estudiadas (espermidina, putrecina) afectaron de manera diferente las tRNA - AMT cerebrales y las tRNA - AMT no neuronales. Por ejemplo Pegg (139) encontró una máxima estimulación de las tRNA metiltransferasa hepática en presencia de 15 - 25 mM putrecina., mientras que la tRNA - AMT cerebral (Fig. 38) requirió una concentración 40 - 60 mM de putrecina para establecer el máximo de actividad enzimática, este último valor puede ser comparado de manera favorable con los valores de 60 mM y 40 - 50 mM de la misma poliamina determinados como óptimos para las tRNA metiltransferasas de células leucémicas (194) y para la tRNA - AMT purificada a partir de hígado de rata (195). Nuestros resultados también muestran que (Fig. 38)

al igual que las tRNA metiltransferasas de hígado de rata (139, 202) la tRNA - AMT cerebral requirió 2 - 3 mM espermidina, en tanto que la tRNA - AMT purificada a partir de hígado (195) requirió una concentración un tanto mayor de espermidina (12-14 mM). Hay que destacar que Hacker (194) encontró dos concentraciones óptimas de espermidina para la metilación en presencia de tRNA metiltransferasas obtenidas a partir de células con leucemia, una alrededor de 3 mM y otra alrededor de 10 mM. Aunque nuestra clasificación de la eficiencia de las diferentes poliaminas como estimulantes de la metilación de tRNA en presencia de la tRNA AMT cerebral concuerda con la noción general en el sentido que putrecina es poliamina más eficiente (193), Moler y colaboradores (206) establecieron recientemente que 10 mM espermidina es la poliamina más eficiente para estimular la metilación de tRNA cuando se utilizaron extractos de cerebro adulto y que por el contrario, espermidina 20 mM fue la poliamina más eficiente en presencia de enzimas aisladas de cerebro fetal o recién nacido.

Cuando la tRNA - AMT cerebral fue utilizada para metilar diferentes especies de tRNA E. coli (tabla 8), tRNA glu<sub>2</sub> y tRNA mostraron ser el mejor y el peor sustrato respectivamente. Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos por Kuchino y Nishimura (168) y los de Glick y colaboradores (64), quienes utilizaron tRNA - AMT

aislada de tejido hepático de rata. Sin embargo, se han demostrado varias peculiaridades en relación a la especificidad de las enzimas tRNA - AMT. De esta manera, usando una preparación parcialmente purificada de tRNA metiltransferasa derivada de hígado de rata en presencia de tRNA<sub>fmet</sub> E. coli como sustrato Wildenauer y colaboradores (207) demostraron diferencias en la naturaleza del residuo formado, dependientes de la presencia de 30 mM cadaverina en conjunción con Mg en la mezcla de incubación; al respecto, se observó la formación de 1-metil adenina si solo cadaverina o cadaverina más Mg estaban presentes, pero no se detectó la base metilada en ausencia de cadaverina. Recientemente, hemos examinado la metilación de tRNA<sub>fmet</sub> en presencia de las tRNA metiltransferasas cerebrales de la rata noruega Hooded a los 6 días post-natales y a los 21 días post-natales también (208, 209), notándose que en el animal de 6 días la formación de 1-metil adenina no excedió el 10% de las bases metiladas formadas, independientemente de la presencia de 2,5 mM espermidina, mientras que a los 21 días la metilación de adenina se elevó a aproximadamente 38% en la ausencia de espermidina representando solo el 5% en presencia de la poliamina. Nuestros resultados (Tabla 9), demuestran que las neuronas contienen niveles apreciables de la actividad tRNA - AMT confirmando así nuestros datos previos (157)

Para demostrar si las neuronas contienen un enriquecimiento selectivo en tRNA - AMT, hemos preparado fracciones que contienen esta enzima a partir de glías cultivadas, glías aisladas a partir de tejido nervioso para luego comparar estas fracciones con otras que contienen enzimas pero derivadas a partir de células neuronales o corteza total. Los resultados (Tabla 9) indican que aunque tanto las fracciones gliales como las neuronales contienen tRNA - AMT, el porcentaje en el cual contribuye la base metilada 1-metil adenina al total de las bases metiladas fue significativamente menor comparado con la corteza total o células neuronales. Así, nuestros resultados muestran que las neuronas son las fuentes más ricas en tRNA - AMT en comparación a las células gliales. Resta por demostrar si las actividades tRNA - AMT obtenidas a partir de las células gliales son residuo específico diferentes como es el caso en Phaseolus vulgaris (56), asimismo queda por demostrar si el enriquecimiento selectivo en tRNA - AMT exhibido por las células neuronales posee un papel funcional.

## 4.5 RESUMEN

Hemos utilizado cuerpos celulares neuronales o corteza cerebral total a partir de ratas machos de 8 días como fuente de la enzima 1-metil adenina-específico tRNA metiltransferasa (tRNA-AMT). La preparación de una enzima 80 veces purificada determinada en presencia de tRNA *E.coli* total como sustrato se llevó a cabo por medio del fraccionamiento en presencia de amonio sulfato, cromatografía sobre hidroxilapatita esferoidal y cromatografía sobre Sephadex G-200. Se estudiaron asimismo, los parámetros cinéticos para el sustrato S-adenosil-L-metionina (SAM) ( $K_m=6$  mM) y el inhibidor S-adenosil-L-homocisteína (SAH) ( $K_i=16$  uM); asimismo, se determinó el efecto de diversos análogos de SAH. S-adenosil L-cisteína (SAC) ( $10^{-4}$ M) y S-adenosil-D-homocisteína (SADH) ( $10^{-4}$ M) produjeron un 35% y un 12% de reducción en la actividad enzimática respectivamente. Los efectos de  $Mg^{++}$ ,  $NH_4^+$  acetato y de las poliaminas espermina putrecina y espermidina sobre la tRNA - AMT cerebral coincidieron en general con los efectos encontrados por estos agentes sobre la tRNA-AMT hepática (64)

Al comparar la capacidad aceptora de sustratos como tRNA glu<sub>2</sub>, tRNA val, tRNA            y tRNA total de E. coli en presencia de la tRNA - AMT se demostró que tRNA glu<sub>2</sub> es el mejor sustrato y tRNA            es el sustrato menos efectivo.

tRNA - AMT aislada a partir de cuerpos celulares neuronales demostró características similares a la enzima aislada de corteza cerebral total. Al comparar las actividades de tRNA - AMT en neuronas y células gliales demostró valores más altos en las primeras. Estos resultados sugieren una localización preferencial de la tRNA - AMT en el compartimento neuronal del cerebro.

5. LA ESTIMULACION DE LA N<sub>2</sub>- METTL Y LA N<sub>2</sub><sup>2</sup>- DIMETIL GUANINA ESPECIFICO, tRNA METILTRANSFERASAS CEREBRALES POR MEDIO DE METIONINA SULFIXIMINA. ESTUDIO IN VIVO

5.1 INTRODUCCION

En esta sección describimos el efecto del agente convulsante N-metionina-DL-sulfoximina (MSO) sobre la actividad de las tRNA metiltransferasas cerebrales.

La literatura describe varios ejemplos en los cuales el proceso de metilación de tRNA puede ser afectado por la administración de drogas in vivo.

Por ejemplo, la administración de DL-etionina, el etil análogo de metionina, induce hepato carcinomas en ratón (210), pero el mecanismo exacto de la acción carcinogénica es desconocido. Etionina inhibe la síntesis proteica y la síntesis de ácidos nucleicos (211- 212) y produce una actividad aumentada de las tRNA metiltransferasas hepáticas (213). De una forma análoga, otros agentes carcinogénicos tales como dimetil nitrosamina, dimetil amino benzeno y N-nitroso metil urea aumentan la actividad de estas enzimas (214- 216)

Dos estudios diferentes han citado el aislamiento de tRNA-metil deficiente a partir de hígados de ratas tratadas con grandes dosis de DL-etionina. El tRNA metil deficiente así obtenido es capaz de aceptar grupos metilos in vitro provenientes de S-adenosil-L-metionina (69,217).

Un trabajo anterior en nuestro laboratorio, demostró que la administración del convulsivante L-metionina- DL-sulfoximina (MSO) en ratas y ratones produjo una marcada disminución de los niveles cerebrales de la molécula metil-donadora, S-adenosil-L-metionina (SAM) (218). Un mecanismo posible para explicar esta disminución de los niveles de SAM señaló que MSO estimulaba la utilización de SAM al aumentar la actividad de las metiltransferasas cerebrales (219,220). Recientes resultados avalan esta teoría, al encontrarse un aumento significativo de las actividades de las enzimas catecol-O- e histamina N-metiltransferasas cerebrales después de tratamiento con MSO (219). A este respecto, se ha demostrado un efecto regional producido por el MSO. Así, mientras que en la rata la histamina N-metiltransferasa permaneció inalterada por tratamiento con MSO en el hipotálamo y cerebro medio su actividad sufrió un aumento en el tallo cerebral, el hipocampo, el cerebelo y la corteza cerebral (219)

Ya que los procesos de metilación heteróloga y homóloga de tRNA son muy activos en el cerebro de la rata (157, 203, 204, 207), resulta posible que MSO como parte de su acción general sobre las metiltransferasas cerebrales actuase sobre la actividad de las tRNA metiltransferasas cerebrales. En este capítulo describimos una estimulación significativa mediada por el tratamiento de MSO in vivo sobre la actividad tRNA metiltransferasa en la corteza cerebral de rata y logramos detectar un efecto específico de la droga sobre las metiltransferasas que catalizan la inserción del grupo metilo en la posición N° 2 de los residuos de guanina. Un reporte preliminar detallando estos hallazgos ha sido publicado (221, 222)

## 5.2 METODOS

### METILACION DE tRNA CON EXTRACTO DE ANIMALES TRATADOS CON MSO.

Ratas albino machos Sprague-Dawley (18 días de edad) fueron inyectadas intraperitonealmente con suero salino o MSO (0,94 mmoles/Kg para una inyección simple ó 0,23 mmoles/Kg una vez al día durante una semana) (222).

La decapitación de los animales se llevó a cabo 90 min, 3 hrs ó 5 hrs después de la inyección única ó al día 7° después de el comienzo del tratamiento crónico de 7 días.

Las cortezas cerebrales se disectaron rápidamente y luego fueron homogenizadas en un homogenizador de vidrio-teflón con 3,5 volúmenes de 10 mM Tris-HCl, pH 7,6; 1 mM ditiotreitól (DTT) y 1 mM MgCl<sub>2</sub>.

El homogenizado se centrifugó a 165.000 x g durante 150 minutos y las tRNA metiltransferasas presentes en la fracción sobrenadante fueron precipitadas por la adición de una solución saturada de amonio sulfato a pH 7,0 hasta alcanzar un grado de saturación equivalente al 80%. El material insoluble fue recuperado por centrifugación y luego el precipitado obtenido resuspendido en 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 que contenía 1 mM EDTA y 1 mM DTT. La suspensión

obtenida fue dializada durante la noche contra 1,5 litros del mismo tampón (un cambio de buffer) y la fracción dializada se utilizó como fuente de tRNA metiltransferasa.

La velocidad de metilación in vitro del tRNA se llevó a cabo en la presencia de 2,5 mM espermidina de la manera como se describió en la sección Métodos 2.2

#### Hidrólisis de [metil-<sup>14</sup>C] tRNA

El procedimiento ha sido descrito previamente en la Sección 2.2

#### Análisis cromatográfico de las [metil-<sup>14</sup>C] bases

El procedimiento ha sido descrito en detalle en la Sección 3.2

#### Determinación de la concentración de proteínas

Las proteínas fueron determinadas de acuerdo al procedimiento de Lowry y colaboradores (160) utilizando albúmina de suero cristalizada como standard.

## 5.3 RESULTADOS

La Tabra 10 muestra que MSO no tiene efecto sobre la actividad cerebral de las tRNA metiltransferasas in vitro en contraste con  $10^{-4}$ M S-adenosil-L-homocisteína (SAH) y bromuro de etidio, los cuales inhiben marcadamente la actividad enzimática. La Fig. 40 muestra el curso de la metilación de tRNA E. coli total in vitro, al usar las tRNA metiltransferasas derivadas de animales previamente tratados durante 90 min 5 hrs. ó una semana con MSO.

La metilación de tRNA por medio de las tRNA metiltransferasas derivadas de animales tratados con MSO fue significativamente mayor que la de los controles durante todos los tiempos experimentales analizados. La tabla 11 compara las tRNA metiltransferasas de animales controles y MSO (3 hrs) en términos de su habilidad para metilar diferentes tipos de tRNA, incluyendo tRNA de hígado de rata. La mayor diferencia entre animales controles y tratados se dio con tRNA E. coli total seguido por tRNA de hígado de rata y finalmente tRNA glu<sub>2</sub> E. coli. Para descartar la posibilidad que los cambios en la metilación de tRNA atribuidos al tratamiento con MSO fueran debidos a un requerimiento diferente de espermidina por parte de las dos preparaciones enzimáticas,

Tabla 10. Efecto de MSO, bromuro de etidio y S-adenosil-L-homocisteina en los tRNA metiltransferasas cerebrales.

Adición	Actividad tRNA metilfransferasa.*
Ninguna	1,402**
MSO, $10^{-4}$ M	1,351
MSO, $10^{-5}$ M	1,425
MSO, $10^{-6}$ M	1,370
Bromuro etidio, $10^{-4}$ M	276
S-adenosil-L-homocisteina, $10^{-4}$ M	186

\* En sobrenadante 154,000 x g de corteza cerebral de rata de 18 días

\*\* dpm [metil  $^{-14}$ C] tRNA/45 min.

Los valores son promedio de 2 determinaciones con menos de un 7% de variación.

Tabla 11. Efecto de MSO en la capacidad de metilación de tRNAs E. coli con metiltransferasas obtenidas a partir de animales tratados con MSO.

tRNA	Control (dpm/mg)	MSO* (dpm/mg)	(%)
1. <u>E. coli</u> tRNA (bulk)	8,179	12,369	+ 51.0
2. <u>E. coli</u> tRNA <sup>Phe</sup>	9,038	12,419	+ 37.4
3. <u>E. coli</u> tRNA <sup>Phe</sup>	8,022	10,222	+ 27.4
4. <u>E. coli</u> tRNA <sup>glu2</sup>	16,500	17,190	+ 4.0
5. Hígado rata tRNA <sup>Phe</sup>	3,140	3,913	+ 24.6

\* 0,94 nmoles/kg, 3 h antes del sacrificio.

Las metiltransferasas fueron obtenidas de ratas de 18 días de edad. Los tubos 1, 2, 4 y 5 contenían 2,5 nM espermidina, mientras que el tubo 3 contenía 15 mM putrescina.

tRNA 100 µg en tubo 1; 20 µg en tubo 2-5. Incubación: 60 min.

Los valores se refieren a la radioactividad (dpm) en el tRNA/mg de proteína cerebral.

Los valores son promedios de 2 determinaciones con menos de 7% de variación.

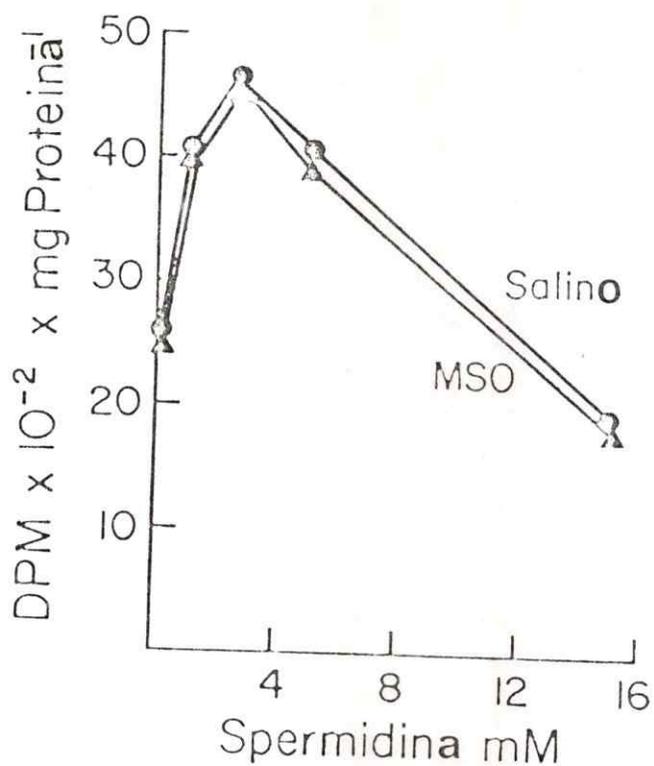


Figura 41. Efecto de espermidina en la metilación de tRNA *E. coli*. Se tomaron alicuotas (40  $\mu$ l) después de 30 min. de incubación a 37°C y luego se procesaron de la manera que se describió en la leyenda de la Figura 40. Los valores representaron un promedio de 2 determinaciones con menos de 7% variación.

Tabla 12. Efecto de MSO in vivo en las tRNA metiltransferasas cerebrales: cambios en la distribución de [metil  $^{-14}\text{C}$ ] bases en tRNA E. coli.

[metil $^{-14}\text{C}$ ] base	Control (dpm/mg)	MSO* (dpm/mg)	<u>MSO</u> Control	Control %	MSO %
N <sup>2</sup> -metil guanina	1,915	4,814	2.51	23.4	38.9 + 15.5
N <sup>2</sup> -dimetil guanina	501	2,402	4.79	6.1	19.4 + 13.3
1-metil adenina	1,348	1,157	0.85	16.5	9.4
5-metil citosina	1,597	1,571	0.98	19.5	12.7
1-metil guanina	1,491	1,401	0.94	18.3	11.3
1-metil hipoxantina	1,327	1,024	0.77	16.2	8.3

\* 0,94 nmoles/kg, 3 h antes del sacrificio.

Las tRNA metiltransferasas fueron obtenidas de corteza cerebral de ratas de 18 días. La mezcla de incubación contenía 100  $\mu\text{g}$  de tRNA E. coli y 2,5 mM espermidina.

Los valores se refieren a la radioactividad (dpm) en la base metilada/mg de proteína cerebral. Incubación 60 min.

Los valores son promedio de 2 determinaciones con menos de 7% de variación.

un estudio de los efectos de las diferentes concentraciones de las poliaminas se llevó a cabo. La Fig. 41 muestra que el efecto máximo estimulador de la poliamina (2,5 mM) es el mismo tanto en animales tratados como en animales controlados.

Hemos estudiado asimismo la especificidad de la base metilada al utilizar E. coli tRNA cuando tRNA fue metilado con enzimas derivadas de animales tratados. Los resultados de este análisis se muestran en la Table 12. La Tabla 12 compara asimismo, la distribución, (como % de la actividad recuperada) de las [metil-<sup>14</sup>C] bases obtenidas después de la metilación de tRNA con enzimas de animales tratados vs controlados. Los resultados indican que hay un 51% de aumento en la metilación total, lo que se muestra en la columna 1 de la Tabla 11, el cual refleja un promedio entre el aumento significativo (2,5 - 4,8 veces) de la metilación de la N<sup>2</sup>-metil y N<sup>2</sup>-dimetil guanina vs la inalterada metilación de guanina en posición 1 y de adenina, citosina e hipoxantina. Los resultados muestran claramente el efecto específico de MSO sobre las actividades de las N<sup>2</sup>-metil y N<sup>2</sup>-dimetil guanina-específico tRNA metiltransferasa derivada de corteza cerebral de rata. En términos cuantitativos el efecto de MSO fue dos veces mayor sobre las N<sup>2</sup>-metil guanina. Aunque este resultado produjo una relación 2:1 en las radioactividades específicas

(N<sup>2</sup>-dimetil guanina vs N<sup>2</sup>-metil guanina), el porcentaje de aumento en las contribuciones de estas dos bases metiladas respecto del contenido total de bases metiladas al utilizar tRNA E. coli total, permaneció constante (15,5% para N<sup>2</sup>-metil guanina vs 13,3% para N<sup>2</sup>-dimetil guanina).

## 5.4. DISCUSSION

Ya que MSO no cambia la actividad de las tRNA metiltransferasas cerebrales cuando se agrega a una mezcla de incubación in vitro, hemos descartado la posibilidad que MSO interactúe con alguno de los componentes de la mezcla de incubación como es el caso de espermidina poliamina que modula el proceso de metilación sw tRNA. Anteriormente, se demostró que MSO ( $10^{-3}$ ,  $10^{-8}$ M) no tenía ningún efecto en la actividad de la histamina N- metiltransferasa parcialmente purificada de cerebro de rata (219). La pre-incubación de MSO con tRNA, fracción enzimática ó S-adenosil metionina a  $37^{\circ}$  durante 10 min también no produjo cambios en la velocidad de formación de [metil- $^{14}$ C] tRNA. Por el contrario, MSO administrado in vivo, ya sea de manera aguda o crónica, aumentó claramente la actividad específica de las tRNA metiltransferasas cerebrales (Fig. 40). Estos resultados no pueden ser atribuídos a diferencias en los niveles endógenos de SAH ya que los extractos cerebrales de animales tratados y controles fueron dializados extensivamente; más aún, un trabajo anterior realizado en este mismo laboratorio, demostró una disminución en los niveles de SAH cerebral después de tratamiento con MSO (223)

El efecto producido por MSO fue fácilmente demostrable en presencia de tRNA E. coli total, como asimismo con tRNA E. coli y de hígado de rata, pero no así con tRNA E. coli glu<sub>2</sub> (Tabla 11). El efecto más marcado se observó con tRNA E. coli total, probablemente a causa del exceso de este sustrato (5 veces) sobre las cantidades de los otros tRNAs utilizados (ver leyenda Tabla 12); de modo que el gran exceso de sustrato disponible saturaba todas las tRNA metiltransferasas presentes en la preparación, incluso aquellas de bajas afinidades (22) permitiendo así la metilación de sustratos con bajas afinidades. Más aún, espermidina (0,1 - 20 mM) en preparaciones de animales tratados con MSO demostró el mismo efecto estimulatorio sobre la metilación de tRNA a concentraciones idénticas a las halladas en animales controles (Fig.41)

Un hecho sorprendente fue la metilación sustancial de tRNA de hígado de rata con las tRNA metiltransferasas cerebrales. Estos resultados son similares a los obtenidos por Simón y colaboradores(141), quienes demostraron una cantidad apreciable de metilación del tRNA de hígado de rata total por medio de las tRNA metiltransferasas derivadas de cerebro de rata adulta. Debemos destacar asimismo, que recientemente se ha demostrado la metilación tRNA metil deficiente aislado a partir de hígado de rata por medio de las tRNA metiltransferasas derivadas de animales normales

(69, 224) y que hemos demostrado en la sección 2 un proceso muy activo de metilación homóloga de tRNA en el cerebro de rata inmadura, en que los tRNA cerebrales (y/o los tRNA precursores) son metilables in vitro por medio de las tRNA metiltransferasas cerebrales en la ausencia de un tRNA exógeno (157, 203).

La radioactividad específica de cada [metil- $^{14}\text{C}$ ] base formada en la tRNA total de E. coli se muestra en la Tabla 12. Los resultados muestran claramente que el aumento en la metilación producida por MSO se concentró en los residuos  $\text{N}^2$ -metil guanina y  $\text{N}_2^2$ -dimetil guanina. Basándose en la observación que se muestra en la Tabla 11, indica que tRNA E. coli es más susceptible a MSO que tRNA glu<sub>2</sub> y a partir del hecho que estos dos tRNA son metilados por  $\text{N}^2$ -guanina tRNA metiltransferasas diferentes de hígado de rata (75, 78, 225, 226) (la enzima I metila en la posición 10' a partir del terminal 5' OH requiriendo para ello de la secuencia S4 UAGCUC; la enzima II metila en posición 27 del terminal 5' y requiere la secuencia CUCG), hemos concluido que MSO ciertamente, aunque no exclusivamente, afecta las tRNA metiltransferasas análogas a la enzima I.

Una explicación alternativa del efecto producido por MSO en la metilación de  $\text{N}^2$ -metil guanina de tRNA E. coli sería que el incremento mediado por MSO responde a una

(69, 224) y que hemos demostrado en la sección 2 un proceso muy activo de metilación homóloga de tRNA en el cerebro de rata inmadura, en que los tRNA cerebrales (y/o los tRNA precursores) son metilables in vitro por medio de las tRNA metiltransferasas cerebrales en la ausencia de un tRNA exógeno (157, 203).

La radioactividad específica de cada [metil- $^{14}\text{C}$ ] base formada en la tRNA total de E. coli se muestra en la Tabla 12. Los resultados muestran claramente que el aumento en la metilación producida por MSO se concentró en los residuos  $\text{N}^2$ -metil guanina y  $\text{N}_2^2$ -dimetil guanina. Basándose en la observación que se muestra en la Tabla 11, indica que tRNA E. coli es más susceptible a MSO que tRNA glu<sub>2</sub> y a partir del hecho que estos dos tRNA son metilados por  $\text{N}^2$ -guanina tRNA metiltransferasas diferentes de hígado de rata (75, 78, 225, 226) (la enzima I metila en la posición 10' a partir del terminal 5' OH requiriendo para ello de la secuencia S4 UAGCUC; la enzima II metila en posición 27 del terminal 5' y requiere la secuencia CUCG), hemos concluido que MSO ciertamente, aunque no exclusivamente, afecta las tRNA metiltransferasas análogas a la enzima I.

Una explicación alternativa del efecto producido por MSO en la metilación de  $\text{N}^2$ -metil guanina de tRNA E. coli sería que el incremento mediado por MSO responde a una

metilación de un residuo diferente al residuo guanílico 10. La enzima II ha sido purificada parcialmente y caracterizada en presencia de diferentes tRNA E. coli (75, 225, 226) tRNA leu<sub>3</sub>, tRNA leu<sub>4</sub> y tRNA fmet fueron los sustratos preferidos, mientras que tRNA aunque posea una guanina en posición 27, resulta ser un sustrato deficiente para la enzima. Se podría pensar entonces, que estando restringida la metilación de tRNA E. coli en posición 27 por medio de las enzimas del tipo II provenientes de animales controles, el acceso a este mismo sitio se hace menos restringido con animales tratados con MSO.

Explicaciones satisfactorias respecto al efecto marcado de MSO sobre la formación de N<sup>2</sup>-dimetil guanina son más difíciles de encontrar. Ya que en eucariotes el residuo guanina N° 10 es metilado por una N<sup>2</sup>-mono metil guanina RNA metiltransferasa (225, 226) y el residuo guanina 27 por una o más enzimas las cuales pueden ambas mono y dimetilar, es posible que la metilación de la guanina 27 para formar la N<sup>2</sup>-dimetil guanina, ya sea con enzimas de controles o experimentales se realice vía guanina-27 específico metiltransferasa (tipo II). Alternativamente, si como sucede en las células KB in vivo utilizadas por Munns y colaboradores (227), en que la formación de N<sup>2</sup>-metil guanina y N<sup>2</sup>-dimetil guanina no es sincrónica, siendo la última sustancialmente más rápida que la primera, es posible que parte del efecto mediado

por MSO en la formación de  $N_2^2$ -dimetil guanina, resulta de el aumento en la metilación de cantidades pre-existentes de  $N^2$ -metil guanina por una actividad (la cual) agrega el segundo grupo metilo en ciertos casos (226). El aumento mucho mayor en la formación de  $N_2^2$ -dimetil guanina, comparado con  $N^2$ -metil guanina (Tabla 12), sugiere que una posibilidad de esta naturaleza es digna de ser investigada.

## 5.5 RESUMEN

La administración de una dosis simple de convulsivante o múltiples dosis subconvulsivantes de L-metionina-D-sulfoximina (MSO) a ratas de 18 días, produce una elevación significativa de la actividad específica de las tRNA metiltransferasas cerebrales, determinadas en un ensayo in vitro utilizando como sustrato tRNA heterólogo o especie homólogo. El aumento fue detectable 90 min después del tratamiento con MSO y persistió durante todo el período preconvulsivo (5 - 6 Hrs). El [metil- $^{14}\text{C}$ ] tRNA fue purificado e hidrolizado para producir las bases metiladas y determinar la distribución cuantitativa de ella por medio de cromatografía líquida de alta velocidad. Un aumento marcado en la formación de  $\text{N}^2$ -[metil- $^{14}\text{C}$ ] y  $\text{N}_2^2$ -[dimetil- $^{14}\text{C}$ ] guanina, fue observado en animales tratados con MSO, demostrándose así una estimulación específica por medio de MSO in vivo y/o  $\text{N}_2^2$ -dimetil guanina específicas tRNAs metiltransferasas.

## 6. EL ESTUDIO IN VIVO DE LOS CAMBIOS EN LA METILACION DE tRNA

### 6.1 INTRODUCCION

La transferencia de grupos metilo a moléculas de tRNA desde metionina por medio de la S-adenosil-L-metionina y con el concurso de las tRNA metiltransferasas dando origen a tRNA metilados, se encuentra bien documentado. Variaciones significativas en la actividad de las tRNA metiltransferasas parecen ocurrir cuando un tejido sufre cambios fisiológicos (141, 157, 228, 232). Los tejidos fetales y embrionarios contienen una actividad mucho más alta de las tRNA metiltransferasas con respecto a los tejidos adultos normales (141, 233).

Esta propiedad (por lo menos en ciertos casos), parece estar relacionada con la diferenciación activa en el lugar de rápido crecimiento, ya que el hígado en regeneración no muestra tal aumento en la actividad tRNA metiltransferasa (67). Además, la actividad tRNA metiltransferasa parece disminuir a lo largo del ciclo de vida postnatal (157, 234).

En esta sección hemos determinado la metilación in vivo del tRNA cerebral de rata a los 8 y 18 días post-na-tales siguiendo una inyección con [metil-<sup>3</sup>H] metionina.

## 6.2 METODOS

Preparación de metil-<sup>3</sup>H tRNA in vivo.

Ratas machos (8 y 18 días de edad), fueron inyectadas intracranealmente vía el ventrículo lateral con L-[metil-<sup>3</sup>H] metionina utilizando una dosis de 4 C/g (25 l) de peso del animal y 45 minutos después los animales fueron sacrificados. Las cortezas cerebrales y los cerebelos fueron disectados y congelados en N líquido. El tejido fue homogenizado en 0,25 M sucrosa, 0,035 M Tris-HCL, 0,025 M KCL, 5 mM MgCl<sub>2</sub> (pH 7,4) y luego centrifugado a 1.000x g durante 15 min (159), luego el tRNA fue extraído del sobrenadante por el método descrito en la sección 2.2.

Hidrólisis de metil-<sup>3</sup>H tRNA.

El procedimiento ha sido descrito en la Sección 2.2.

### Análisis cromatográfico de [metil-<sup>3</sup>H] bases

El procedimiento ha sido descrito en la Sección 3.2

### Cromatografía DEAE-celulosa de [metil-<sup>3</sup>H] tRNA

El tRNA que ha sido previamente acilado, fue cromatografiado en una columna de DEAE celulosa como se describió en Métodos, Sección 2.2

### Electroforesis del tRNA

Hemos adoptado la técnica descrita por Peacock y Dingman (235), la cual emplea geles de acrilamida al 10%. El tampón de electroforesis contenía 108 g de Tris, 9.3 g de EDTA-Na<sub>2</sub> y 55.0 g ácido bórico en 1 lt de solución. La solución tampón se utilizó sin diluir para la preparación del gel y fue 10 veces diluida para llenar el reservorio de los tampones.

Las soluciones stock fueron hechas de la siguiente manera:

1)	Acrilamida	19%	peso/volumen
	bis acrilamida	1%	peso/volumen
2)	TEMED	0,5%	peso/volumen
3)	Amonio persulfato	1,6%	peso/volumen
4)	Solución tampón (no diluida)		

Composición del gel a 10%

Solución 1	8.0 ml
Solución 2	1.0 ml
Solución 3	1.0 ml
Solución 4	1.6 ml
Agua	4.4 ml

Previa a la electroforesis, los geles fueron corridos durante 45 min a 5 mA/gel.

Las muestras fueron diluidas 4:5 v/v con una solución de sacarosa al 50% que contenía azul bromofenol justo antes de depositarse en los geles.

[metil-<sup>3</sup>H] tRNA, preparado como se describió en la Sección 2.2 y 6.2 fue subsecuentemente purificado por pasaje a través de una columna de DEAE-celulosa como se describió anteriormente (69).

La pureza del tRNA recuperado después de la cromatografía, fue determinada por electroforesis. Los resultados indican que entre el 90 y el 95% de la radioactividad migró en la región 4S.

Las muestras de tRNA obtenidas como se describió anteriormente, fueron hidrolizadas y cromatografiadas en una columna μBondapak/C18 como se describió en la sección Métodos

## 3.2

La Tabla 13 ilustra la distribución de las [metil-<sup>3</sup>H] bases constituyentes de tRNA en cerebelo de rata de 8 días y corteza de la misma edad al recuperarse en los eluidos de la cromatografía HPLC.

1-metil adenina, 5-metil citosina, 1-metil hipoxantina, N<sup>2</sup>-metil guanina y N<sup>2</sup>-dimetil guanina, dieron cuenta del 84% y el 81% de la actividad recuperada en el tRNA de corteza cerebral y cerebelo respectivamente. El resto de la radioactividad en la corteza y el cerebelo se distribuyó

entre las siguientes bases metiladas: 1-metil guanina, 5-metil uracilo, 7-metil guanina y N<sup>6</sup>-metil adenina.

1- [metil-<sup>3</sup>H] adenina en el tRNA de la corteza fue 50% más alto que en el tRNA de cerebelo. Inversamente, 1- [metil-<sup>3</sup>H]guanina en el tRNA de corteza cerebral fue menos de la mitad del valor obtenido en tRNA cerebelar. Asimismo, la cantidad de N<sup>6</sup>-metil adenina en el cerebro, correspondió al doble de la cantidad de la misma base metilada encontrada en la corteza cerebral (5,2 vs 2,5%).

La Tabla 14 ilustra los resultados obtenidos utilizando animales de 18 días de edad bajo las mismas condiciones. La distribución de la radioactividad en cada región cerebral, fue la misma que a los 8 días de edad. De nuevo 1 [metil-<sup>3</sup>H]adenina en el tRNA de la corteza fue significativamente más alto que en el tRNA cerebelar (30%).

La diferencia en el contenido de 1-[metil-<sup>3</sup>H]guanina detectada entre el cerebelo de 8 días de edad y la corteza de la misma edad, no fueron visible a los 18 días de edad.

Al comparar los resultados obtenidos en la Tabla 14 con aquellos publicados por Randerath y colaboradores (236) para cerebro humano normal (Tabla 15), aparecen las siguientes diferencias:

- a) Una mayor proporción de 1-metil adenina en corteza cerebral de rata (18%) y cerebelo (11%) (1,5 a 2 residuos por tRNA vs alrededor 1 en cerebro humano).
- b) Una mayor proporción de N<sup>2</sup>-metil guanina en corteza de rata y cerebelo (5 a 6%).
- c) Una reducción de la proporción de 5-metil citosina tanto en corteza de rata (13%) como en cerebelo (12%) (1,5 - 2 residuos/tRNA en cerebro humano vs alrededor de 1 en cerebro de rata.)
- d) Una reducción en el cerebelo (5%) y la corteza (6%) de rata de 7-metil guanina y en el contenido de 5 metil uracilo cortical (4%).

## 6.4 DISCUSION

Hemos caracterizado la distribución de [metil-<sup>3</sup>H] bases componentes del tRNA los cuales han sido caracterizados in vivo por medio de una inyección ventricular de [metil-<sup>3</sup>H] metionina.

Hemos seleccionado un tiempo de inyección de 45 min, pues se ha demostrado que la máxima incorporación del precursor [metil-<sup>3</sup>H] metionina en el tRNA cerebral, después de una dosis simple ocurre entre los 46 y 60 min. después de la inyección. (237)

El porcentaje de distribución de las bases metiladas medido por la radioactividad recuperada después de cromatografía HPLC no cambió drásticamente con la edad. Sin embargo, se detectaron cambios específicos en la distribución de [metil-<sup>3</sup>H] bases al analizar regiones diferentes del cerebro (1-metil adenina y 1-metil guanina)

El único cambio importante relacionado con la edad en la distribución de bases metiladas, lo constituyo el cambio en el contenido de N<sup>2</sup>-metil guanina cortical, 16% a los 8 días vs 21% a los 18 días. Estos datos confirman nuestros resultados anteriores en que un aumento en la metilación homóloga correspondiente a la N<sup>2</sup>-metil guanina cerebral fue determinada en ratas de 18 días de edad al ser comparadas con

animales más jóvenes. Este es el primer intento para correlacionar la metilación de tRNA cerebral con el desarrollo del tejido cerebral.

Al comparar nuestros resultados con aquellos obtenidos utilizando cerebro humano adulto, se encontró un acuerdo general en la distribución de las bases metiladas, excepto la 1-metil adenina y la 5-metil citosina (Tabla 15)

Los resultados obtenidos sugieren la existencia de importantes cambios en la distribución de tRNAs isoacceptores en las células del cerebro durante el desarrollo post-natal. Además, los datos sugieren que la metilación de tRNA puede ser un proceso celular altamente específico, el cual exhibe diferencias en neuronas de tipo diferente reafirmando así el concepto de un alto grado de especificidad conferido por la metilación sobre las moléculas de tRNA aceptoras.

## 6.5 RESUMEN

Hemos determinado la metilación de tRNA de corteza cerebral y cerebelo en ratas de 8 y 18 días de edad.

Hemos detectado las siguientes [metil-<sup>3</sup>H] bases constituyentes en el tRNA de corteza cerebral y cerebelo: 1-metil adenina, 5-metil citosina, 1-metil guanina, 5-metil uracilo, 1-metil hipoxantina, 7-metil guanina, N<sup>2</sup>-metil guanina, N<sup>6</sup>-metil adenina y N<sup>2</sup>-dimetil guanina.

Se han detectado diferencias en la distribución de las [metil-<sup>3</sup>H] bases provenientes de la corteza y el cerebelo en los casos de la 1-metil adenina y 1-metil guanina.

El aumento relativo en la N<sup>2</sup>-metil guanina cortical con la edad, confirma nuestros resultados previos obtenidos al estudiar la metilación homóloga del tRNA in vitro (157) entre los 3 y 18 días de edad.

## CONCLUSIONES

El presente estudio ilustra evidencias que demuestran la existencia de una variedad de residuo-específico metiltransferasas en el cerebro de la rata, como asimismo, describe la naturaleza de las bases metiladas que se forman al hacer reaccionar las tRNA metiltransferasas cerebrales en presencia de tRNA E. coli.

Hemos observado una marcada disminución de la actividad tRNA metiltransferasa durante el período post-natal entre 3 y 43 días en la corteza cerebral, el cual contrasta con la evolución de la actividad enzimática cerebelar (Dainat, Salas y Sellinger, observaciones no publicadas), donde se encuentra que la actividad aumenta primeramente entre los 3 y 10 días post-natales, para disminuir subsecuentemente al igual que en la corteza. Estos resultados se agregan a las evidencias que sugieren que la corteza cerebral y el cerebelo poseen diferentes patrones de maduración. Resultados también sugieren que una disección regional del cerebro es esencial para la determinación exacta de las variaciones específicas en la metilación de tRNA de cada región cerebral.

Los resultados obtenidos al incubar tRNA E. coli con sobrenadantes obtenidos de corteza cerebral, confirman una vez más la premisa que sostiene que, "mientras más

evolucionado se sitúe un organismo en la escala filogenética mayor es el contenido de modificaciones que poseerá su tRNA". al mismo tiempo que apoya la idea que sostiene que el tRNA citoplasmático de mamífero posee un mayor contenido de bases metiladas que el tRNA bacteriano.

Es interesante destacar en este momento, que al comparar las [metil- $^{12}\text{C}$ ] bases existentes en tRNA de cerebro humano con las [metil- $^{14}\text{C}$ ] bases presentes en tRNA E. coli una vez que este ha sido metilado por las tRNA metiltransferasas cerebrales demuestra diferencias cualitativas importantes. Así, mientras tRNA de cerebro humano contiene 1-metil adenina, 6-metil adenina, 1-metil guanina,  $\text{N}_2^2$ -dimetil guanina, 7-metil guanina, 3-metil citosina, 5-metil citosina y 5-metil uracilo, aparentemente carece en 2-metil adenina. Por el contrario, el [metil- $^{14}\text{C}$ ] tRNA E. coli metilado in vitro demostró no poseer  $\text{N}^6$ -metil adenina y tampoco 3-metil citosina, pero si contiene 1-metil hipoxantina.

Una comparación cuantitativa similar entre las [metil- $^3\text{H}$ ] bases derivadas de corteza y cerebelo provenientes de tRNA metilado con [metil- $^3\text{H}$ ] metionina in vivo con las [metil- $^{12}\text{C}$ ] bases encontradas en tRNA de cerebro humano reveló las siguientes diferencias: Una mayor proporción de 1-metil adenina y  $\text{N}^2$ -metil guanina tanto en la corteza como el cerebelo de rata, comparada al cerebro humano; una reducción

en la proporción de 5-metil citosina y 7-metil guanina cortical y cerebelar respecto del cerebro humano.

Nuestros resultados demuestran también que ratas entre 3 y 8 días de edad post-natal, contienen en las cortezas cerebrales aceptores endógenos de grupos metilos, los cuales no son ni proteínas, ni DNA y que son sensibles a la hidrólisis por la ribonucleasa pancreática. Este material fue caracterizado inambiguamente como tRNA. Por lo tanto, hemos establecido que las tRNA metiltransferasas pueden introducir metil-<sup>14</sup>C grupos in vitro, principalmente en los residuos guanina del tRNA dando origen a tRNAs, los cuales contienen N<sup>2</sup> y (1+7 metil guanina) (metilación homóloga)

Existe la posibilidad, sin embargo, que los resultados observados no sean el reflejo de un proceso de metilación homóloga de tRNA, pero que en cambio representan un proceso de metilación heterocelular, en el que tRNAs neuronales son metiladas por tRNAs metiltransferasas gliales y que tRNA gliales lo sean por las enzimas provenientes de las células neuronales. No hemos descartado la posibilidad que parte de la metilación homóloga del tRNA involucre las modificaciones de TRNA precursores.

Al estudiar los efectos de las poliaminas sobre la metilación de tRNA hemos demostrado su efecto estimulatorio sobre la metilación de tRNA total E coli por medio de las tRNA

metiltransferasas derivadas de cortezas cerebrales de ratas inmaduras, como asimismo con las enzimas derivadas de las pericarias neuronales. Por el contrario, hemos demostrado que espermidina inhibe la metilación homóloga del tRNA.

Hemos purificado parcialmente la enzima adenina-1-específico tRNA metiltransferasa, a partir de cortezas cerebrales de ratas jóvenes, y demostramos también, que las células neuronales poseen un contenido mayor de esta enzima cuando se le compara con los niveles de esta enzima en la corteza total. La constante  $K_m$  aparente determinada para la adenina-1 tRNA metiltransferasa corresponde a 6 M, valor más elevado que el determinado por Glick y colaboradores (64), para la enzima derivada de hígado de rata.

Finalmente, hemos alterado el patrón de metilación de tRNA E. coli obtenido con las tRNA metiltransferasas cerebrales al administrar a ratas L-metionina-DL- sulfoximina (MSO) agente convulsante análogo de lametionina, el cual anteriormente había probado poseer un efecto depletivo de la S-adenosil-L-metionina cerebral en la rata.

Los resultados obtenidos en animales tratados con MSO demostraron un aumento significativo de la formación de  $N^2$ - metil guanina y  $N_2^2$ -dimetil guanina y de esta manera, se estableció una estimulación específica por medio de MSO de las  $N^2$ -metil y/o  $N_2^2$ -dimetil guanina-específico tRNA metiltransferasas cerebrales.

## REFERENCIAS

1. Burdon, R.H. (1971) En Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol. Vol. 11, (ed. Davidson, J.N., y Cohn, W.E.) pp. 57 Acad. Press, New York.
2. Staehelin, M., Rogg, H., Baguley, B.C., Ginsberg, T. y Wehrli, W. (1968) Nature, 219, 1363.
3. Holmquist, R., Jukes, T.H. y Pangburn, S. (1973) J. Mol. Biol. 78, 91.
4. Jukes, T.H. (1966) Biochem. Biophys. Res. Commun., 24, 744
5. Sanger, F. Brownlee, G.G., y Barrell, B.G. (1965) J. Mol. Biol., 13, 373.
6. Randerath, K., Chia, L.S.Y., Gupta, R.C., Randerath, E., Hawkins, E.R., Brum, C.K. y Chong, S.H. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun., 63, 157.
7. Gillum, A., Urquhart, N., Smith, M. y Rajbhandary, U.L. (1975) Cell, 2, 85.
8. Gillum, A., Roe, B., Anandaraj, M.P.J.S. y Rajbhandary, U.L. (1975) Cell, 2, 95.
9. Rich, A y Rajbhandary, U.L. (1976) Ann. Rev. Biochem., 45, 805.
10. Piper, P.W. y Clark, B.F.C. (1974) Nature, 247, 516.
11. Simsek, M., Rajbhandary, U.L., Boisnard, M. y Petrissant, G. (1974) Nature, 247, 518.

12. Barrell, B.G. y Clark, B.F.C. (1974) Handbook of Nucl. Acids Sequences; Oxford: Joynson-Bruvers Ltd.
13. Hayashi, H., Fisher, H. y Soll, D. (1969) Biochemistry 8, 3680.
14. Soll, D. (1971) Science, 173, 293.
15. Ishikura, H., Yamada, Y., Murao, K., Saneyoshi, M. y Nishimura, S. (1964) Biochem. Biophys. Res. Commun., 37, 990.
16. Yarus, M. y Barrell, B.G. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun., 43, 729.
17. Short, N.A., Sander, E.G. y Rennert, O.M. (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun., 52, 223.
18. Hall, R.H. (1970) En Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol., Vol. 10, (ed. Davidson, J.N. y Cohn, W.E.), pp. 57 Acad. Press, New York.
19. Kimball, M.E. y Soll, D. (1974) Nucleic Acids Res., 1, 1773.
20. McLennan, B.D., (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun., 65, 345.
21. Helgeson, J.P. (1968) Science, 161, 974.
22. Armstrong, D.J., Burrows, W.J., Skoog, F., Ray, K.L. y Soll, D. (1969) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 63, 834.
23. Carbon, J., David, H. y Studier, M.H. (1968) Science, 161, 1146.

24. Baczynskyj, L., Biemann, K y Hall, R.H. (1968) *Science*, 159, 1481.
25. Lipsett, M.N. (1965) *J. Biol. Chem*, 240, 3975.
26. Wagner, L.P. y Ofengand, J. (1970) *Biochim. Biophys. Acta*, 204, 620.
27. Zachau, H.G. (1969) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 8, 711.
28. Mittleman, A., Bonney, R., Hall, R.H. y Grace, J.T. (1969) *Biochim. Biophys. Acta*, 179, 242.
29. Holley, R.W., Apgar, J., Everett, G.A., Madison, J.T., Marquisee, M., Merrill, S.H., Penswick, J.R. y Zamir, A. (1965) *Science*, 147, 1462.
30. Kim, S.H., Sussman, J.L., Suddath, F.L., Quigley, G.J., McPherson, A., Wang, A.H.J., Seeman, N.C. y Rich, A. (1974) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 71, 4970.
31. Nishimura, S. (1972) *En Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol*, Vol. 12 (ed. Davidson, J.N. y Cohn. W.E.) pp.49 Acad. Press, New York.
32. Robertus, J.D., Ladner, J.E., Finch, J.T., Rhodes, D., Brown, R.S., Clark, B.F.C. y Klug, A. (1974) *Nucleic Acids Res.*, 1, 927.
33. Gamble, R.C. y Schimmel, P.R. (1974) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 71, 1356.
34. Unlenbeck, O.C., Baller, J. y Doty, P. (1970) *Nature*, 225, 508.
35. Yang, C.H. y Soll, D. (1974) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 71, 2838.

36. Squires, C., Konrad, B., Kirschbaum, J. y Carbon, J. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 70, 438.
37. Schweizer, E., MacKechnie, C. y Halvorson, H.O. (1969) J. Mol. Biol., 40, 261.
38. Clarkson, S.G., Birnstiel, M.L. y Serra, V. (1973) J. Mol. Biol., 79, 391.
39. Burdon, R.H. (1975) Brookhaven Symposia in Biol., Vol. 26, (ed. Dunn, J.J.), pp. 138 Upton, New York.
40. Schafer, K.P. y Soll, D. (1974) Biochimie, 56, 795.
41. Choe, B.K. y Taylor, M.W. (1972) Biochim. Biophys. Acta, 272, 275.
42. Burdon, R.H. y Clason. A.E. (1969) J. Mol. Biol., 39, 113.
43. Bernhardt, D. y Darnell, J.E. (1969) J. Mol. Biol., 42, 43.
44. Arnold; H.H., Schmidt, W., Raettig, R., Sandig, L., Domdey, H. y Kersten, H. (1976) Arch. Biochem. Biophys., 176, 12.
45. Kersten, H., Sandig, L. y Arnold, H.H. (1975) FEBS. Letters, 55, 57.
46. Delk, A.S. y Rabinowitz, J.C. (1975) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 72, 528.
47. Delk, A.S., Romeo, J.M., Nagle, D.P. Jr. y Rabinowitz, J.C. (1976) J. Biol. Chem., 251, 7649.

48. Munns, T.W. y Katzman, P.A. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 53, 119.
49. Randerath, E., Chia, L.S.Y., Morris, H.P. y Randerath, K. (1974) *Biochim. Biophys. Acta*, 366, 159.
50. Hayashi, H., Fisher, H y Soll, D. (1969) *Biochemistry*, 8, 3680.
51. Roe, B.A., Chen, E.Y. y Tsen, H.Y. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 68, 1339.
52. Klagsbrun, M. (1973) *J. Biol. Chem.*, 248, 2612.
53. Bjork, G.R. y Neidhardt, F.C. (1973) *Virology*, 52, 507.
54. Gantt, R.R., Stromberg, K.J. y Montes de Oca, F. (1971) *Nature*, 234, 35
55. Klagsbrun, M. (1973) *J. Biol. Chem.*, 248, 2606
56. Dubois, E.G., Dirheimer, G. y Weil, J.H. (1974) *Biochim. Biophys. Acta*, 374, 332.
57. Kahle, P., Hoppe-Seyler, P. y Kroger, H. (1971) *Biochim. Biophys. Acta*, 240, 384.
58. Liau, M.C., O'Rourke, S.M. y Hurlbert, R.B. (1972) *Biochemistry*, 11, 629
59. Agris, P.F., Woolverton, D.K. y Setzer, D. (1976) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 73, 3857.
60. Hurwitz, J., Gold, M. y Anders, M. (1964) *J. Biol. Chem.*, 239, 3462.
61. Smolar, N., Hellman, U y Svensson, I. (1975) *Nucleic Acids Res.*, 2, 993.

62. Aschhoff, H.J., Elten, H., Arnold, H.H., Mahal, G., Kersten, W., y Kersten, H. (1976) *Nucleic Acids Res.*, 3, 3109.
63. Chan, T. y Fraser, M.J. (1972) *Life Sciences*, 11, 793.
64. Glick, J.M., Ross, S. y Leboy, P.S. (1975) *Nucleic Acids Res.*, 2, 1639.
65. Kerr, S.J. (1974) In *Methods in Enzymology*, Vol. XXIX, Part E, (ed. Grossman, L. y Moldave, K.) pp. 716, Acad. Press, New York.
66. Zappia, V., Zydek-Cwick, C.R. y Schlenk, F (1969) *J. Biol. Chem.*, 244, 4499.
67. Rodeh, F., Feldman, M y Littauer, U.Z. (1967) *Biochemistry*, 6, 45.
68. Pegg, A.E. (1971) *FEBS. Letters*, 16, 13.
69. Jank, P. y Gross, H.J. (1974) *Nucleic Acids Res.*, 1, 1259.
70. Wainfan, E., Moller, M.L., Maschio, F.A. y Balis, M.E. (1975) *Cancer Res.*, 35, 2830.
71. Lu, L.W., Chiang, G.H. y Randerath, K. (1976) *Nucleic Acids Res.*, 3, 2243.
72. Wainfan, E., Tscherne, J.S., Maschio, F.A. y Balis, M.E. (1977) *Cancer Res.*, 37, 865.
73. Marcu, K. y Dudock, B. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 62, 798.
74. Liau, M.C., Hunt, J.B., Smith, D.W. y Hurlbert, R.B. (1973) *Cancer Res.*, 33, 323.

75. Kuchino, Y. y Nishimura, S. (1970) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 40, 306.
76. Gambaryan, A.S., Venkstern, T.V. y Bayev, A.A. (1976) *Nucleic Acids Res.*, 3, 2079.
77. Kuchino, Y., Seno, T. y Nishimura, S. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 43, 476.
78. Nau, F. (1976) *Biochimie*, 58, 629.
79. Wevers, W.F., Baguley, B.C. y Ralph, R.K. (1966) *Biochim. Biophys. Acta*, 123, 503.
80. Hatfield, D. y Portugal, F.H. (1970) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 67, 1200.
81. Ortwerth, B.J. (1971) *Biochemistry*, 10, 4190.
82. Wallace, R.B. y Freeman, K.B. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 60, 1440.
83. Denis, A., Mazabraud, A. y Wegnez, M. (1975) *Eur. J. Biochem.* 58, 43.
84. Christner, P.J. y Rosenbloom, J. (1976) *Arch. Biochem. Biophys.*, 172, 399.
85. Melchers, F. y Zachau, H.G. (1965) *Biochim. Biophys. Acta*, 95, 380.
86. Stern, R. y Littauer, U.Z. (1968) *Biochemistry*, 7, 3469.
87. Merrick, W.C. y Dure, L.S. III. (1972) *J. Biol. Chem.*, 247, 7988.
88. Goss, D.J. y Parkhurst, L.J. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 59, 181.

89. Duncan, R.E. y Gilham, P.T. (1975) *Anal. Biochem.*, 66, 532.
90. Salomon, R., Fuchs, S., Aharonov, A., Gireon, D. y Littauer, U.Z. (1975) *Biochemistry*, 14, 4046.
91. Kelmers, A.D. y Heatherly, D.E. (1971) *Anal. Biochem.*, 44, 486.
92. Kelmers, A.D., Weeren, H.O., Weiss, J.F., Pearson, R.L., Stulberg, M.P. y Novelli, G.D. (1971) In *Methods in Enzymology*, Vol. XX, Part C, (ed. Moldave, K. y Grossman, L.), pp. 9, Acad. Press, New York.
93. Pearson, R.L., Hancher, C.W., Weiss, J.F., Holladay, D.W. y Kelmers, A.D. (1973) *Biochim. Biophys. Acta*, 294, 236.
94. Hentzen, D., Fournier, A. y Garel, J.P. (1973) *Anal. Biochem.* 53, 299.
95. Anandaraj, M.P.J.S. y Roe, B.A. (1975) *Biochemistry*, 14, 5068.
96. Roe, B.A. (1975) *Nucleic Acids Res.*, 2, 21.
97. Frazer, J.M. y Yang, W.K. (1972) *Arch. Biochem. Biophys.*, 153, 610.
98. Murthy, M.R.V., Roux, H. y Thenot, J.P. (1975) *J. Neurochem.*, 22, 19.
99. Murthy, M.R.V., Roux, H. y Thenot, J.P. (1975) *J. Neurochem.*, 24, 1173.
100. Kaplan, B.B., DeLeon, V. y Sirlin, J.L. (1971) *J. Neurochem.*, 18, 845.

101. DeLeon, V., Yang, W.K. y Sirlin, J.C. (1975) *Differentiation*, 4, 65.
102. Borkowski, T. y Brzuskiwicz-Zarnowska, H. (1975) *J. Neurochem.*, 25, 641.
103. Sueoka, N. y Kano-Sueoka, T. (1970) In *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.*, Vol. 10, (ed. Davidson, J.N. y Cohn, W.E.), pp. 23, Acad. Press, New York.
104. Lucas-Lenard, J. y Lipmann, F. (1971) *Ann. Rev. Biochem.*, 40, 409.
105. Araya, A., Krauskopf, M. y Siddiqui, M.A.Q. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 67, 924.
106. Delaney, P. y Siddiqui, M.A.Q. (1975) *Develop. Biol.*, 44, 54.
107. Lassam, N.J., Lerer, H. y White, B.N. (1976) *Develop. Biol.*, 49, 268.
108. Garel, J.P. (1976) *Nature*, 260, 805.
109. Juarez, H., Juarez, D., Hedgcoth, C. y Ortwerth, B.J. (1975) *Nature*, 254, 359.
110. Litt, M. y Kabat, D. (1972) *J. Biol. Chem.*, 237, 6659.
111. Smith, D.W.E. (1975) *Science*, 190, 529.
112. Garel, J.P. (1974) *J. Theor. Biol.*, 43, 211.
113. Thiebe, R. y Zachau, H.G. (1968) *Eur. J. Biochem.*, 5, 546.
114. Grunberger, D., Weinstein, B. y Mushinsky, J.F. (1975) *Nature*, 253, 66.

115. Miller, J.P., Hussain, Z. y Schweizer, M.P. (1976) Nucleic Acids Res., 3, 1185.
116. Sawyer, R.C., Harada, F. y Dahlberg, J.E. (1974) J. Virology, 13, 1307.
117. Waters, L.C., Mullin, B.C., Ho, T.J. y Yang, W.K. (1975) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 72, 2155.
118. Yot, P., Pinck, M., Haenni, A.L., Durantou, H.M. y Capeville, F. (1970) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 67, 1345.
119. Cavalieri, L.F. y Yamaura, I. (1975) Nucleic Acids Res., 2, 2315.
120. Cassio, D. (1975) J. Bacteriol., 125, 589.
121. Cassio, D., Mathien, Y. y Waller, J.P. (1975) J. Bacteriol., 123, 580.
122. Twardzik, D.R., Grell, E.H. y Jacobson, K.B. (1971) J. Mol. Biol., 57, 231.
123. Jacobson, B. (1971) Nature New Biol., 231, 17.
124. Littauer, U.Z. y Inouye, H. (1973) Ann. Rev. Biochem., 101, 434.
125. Brenchley, J.E. y Williams, L.S. (1975) Ann. Rev. Biochem., 29, 251.
126. Jervis, H.H. y Debusk, A.G. (1975) Nature, 258, 160.
127. Corhelis, P., Claissen, E. y Claissen, J. (1975) Nucleic Acids Res., 2, 1153.

128. Krauss, G., Peters, F. y Maass, G. (1976) *Nucleic Acids Res.*, 3, 631.
129. Rennert, O.M. y Hancock, R.L. (1970) *Growth*, 34, 209.
130. Soffer, R.L. (1974) *Advan. Enzymol.*, 40, 91.
131. Gould, R.M. y Lennarz, W.J. (1970) *J. Bacteriol.*, 104, 1135.
132. Roberts, R.J. (1972) *Nature New Biol.*, 237, 44.
133. Bunsted, R.M., Dahl, J.L., Soll, D. y Strominger, J.L. (1968) *J. Biol. Chem.*, 243, 770.
134. Roberts, W.S.L., Strominger, J.L. y Soll, D. (1968) *J. Biol. Chem.*, 243, 749.
135. Stewart, T.S., Roberts, R.J. y Strominger, J.L. (1971) *Nature*, 230, 36.
136. Klagsbrun, M. (1972) *J. Biol. Chem.*, 247, 7443.
137. Starr, J.L. y Sells, B.H. (1969) *Physiol. Rev.*, 49, 623.
138. Pegg, A.E. y Hawks, A.M. (1974) *Biochem. J.*, 137, 229.
139. Pegg, A.E. (1971) *Biochim. Biophys. Acta*, 232, 630.
140. Pegg, A.E. (1972) *FEBS Letters*, 22, 339.
141. Simon, L.N., Glasky, A.J. y Rejal, T.H. (1967) *Biochim. Biophys. Acta*, 142, 88.
142. Guroff, G. y Brodsky, M. (1971) *J. Neurochem.*, 18, 2077.
143. Mezei, C. y Hu, Y.-W. (1972) *J. Neurochem.*, 19, 2071.
144. Johnson, T.C., Mathews, R.A. y Chou, L. (1974) *J. Neurochem.*, 23, 489.

145. Bacharach, U. (1973) In Function of Naturally Occurring Poly-amines; pp. 63, Academic Press, New York, London.
146. Leboy, P.S. y Piester, P. (1973) In Polyamines in Normal and Neoplastic Growth, (ed. Russell, D.H.) pp. 103, Raven Press, New York.
147. Russell, D.H. y McVicker, T.A. (1972) *Biochim. Biophys. Acta*, 259, 247.
148. Seiler, N. y Lamberty, U. (1975) *J. Neurochem.*, 24, 5.
149. Seiler, N. y Schmidt-Glenewinkel, T. (1975) *J. Neurochem.*, 24, 791.
150. Santi, D.V. y Webster, R.W.Jr. (1975) *J. Biol. Chem.*, 250, 3874.
151. Matsuzaki, K. y Takeda, Y. (1973) *Biochim. Biophys. Acta*, 308, 339.
152. Igarashi, K., Takahashi, K. y Hirose, S. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 60, 234.
153. Takeda, Y. y Matsuzaki, K. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 59, 1302.
154. Schreier, A.A. y Schimmel, P.R. (1975) *J. Mol. Biol.*, 93, 323.
155. Takeda, Y. y Ohnishi, T. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 63, 611.
156. Sellinger, O.Z., Azcurra, J.M., Johnson, D.E., Ohlsson, W.G. y Lodin, Z. (1971) *Nature New Biol.*, 230, 253.

157. Salas, C.E., Cummins, C.J. y Sellinger, O.Z. (1976) *Neurochem. Res.*, 1, 369.
158. Mandell, J.D. y Hershey, A.D. (1960) *Anal. Biochem.*, 1, 66.
159. Muramatsu, M. y Fujisawa, T. (1968) *Biochim. Biophys. Acta*, 157, 476.
160. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.*, 193, 265.
161. Gantt, R. y Julian, B. (1973) *Anal. Biochem.*, 54, 283.
162. Klagsbrun, M. (1971) *Virology*, 44, 153.
163. Frazer, J.M. y Yang, W.-K. (1972) *Arch. Biochem. Biophys.*, 153, 610.
164. Yang, W.-K. y Novelli, G.D. (1971) En *Methods Enzymology*, Vol. XX, Part C, (ed. Grossman, L. y Moldave, K.) pp. 44, Acad. Press, New York.
165. Barra, H.S., Uñates, L.E., Saavedra, M.S. y Caputto, R. (1972) *J. Neurochem.*, 19, 2289.
166. Hancher, C.W., Pearson, R.L. y Kelmers, A.D. (1974) En *Methods Enzymology*. Vol. XXIX, Part E, (ed. Grossman, L. y Moldave, K.) pp. 510. Acad. Press, New York.
167. Mandel, P.S. y Jacob, M. (1972) En *Handbook of Neurochemistry*, Vol. 5A (ed. Lajtha, A.) pp. 165, Plenum Press, New York.
168. Azcurra, J.M., Sellinger, O.Z. y Carrasco, A.E. (1975) *Brain Res.*, 86, 144.

169. Shaskan, E.G., Haraszti, J.H. y Snyder, S.H. (1973) J. Neurochem., 20, 1443.
170. Schmidt, G.L. y Cantoni, G.L. (1973) J. Neurochem., 20, 1373.
171. Kremzner, L.T. (1973) En Polyamines in Normal and Neoplastic Growth, (ed. Russell, D.H.) pp. 27, Raven Press, New York.
172. Kremzner, L.T., Barrett, R.E. y Terrano, M.J. (1970) Ann. N.Y. Acad. Sci., 171, 735.
173. Brighetti, S., Casagrande, A., Cupello, A. y Lazzarini, G. (1971) Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 48, 979.
174. Lesiewicz, I. y Dudock, B. (1977) Fed. Proc., 36, 705 p.
175. Munns, T.W. y Sims, H.F. (1975) J. Biol. Chem., 250, 2143.
176. Daniel, V., Grimberg, J.I. y Zeevi, M. (1975) Nature, 257, 193.
177. Trottier, B. (1974) Doctoral Dissertation, Department Biochemistry, Universite Laval, School of Medicine, Quebec City, Québec, Canadá.
178. Kuchino, Y. y Nishimura, S. (1974) Biochemistry, 13, 3683.
179. Agris, P.F., Spremulli, L.L. y Brown, G.M. (1974) Arch. Biochem. Biophys., 162, 38.
180. Iwanami, Y. y Brown, G.M. (1968) Arch. Biochem. Biophys., 124, 472.

181. Kan, L.S., Ts'o, P.O.P., Haar, F.V.D., Sprinzl, M. y Cramer, F. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 59, 22.
182. Munns, T.W., Podratz, K.C. y Katzman, P.A. (1974) *Biochemistry*, 13, 4409.
183. Lakings, D.B. y Gehrke, C.W. (1972) *Clin. Chem.*, 18, 810.
184. Lakings, D.B., Waalkes, T.P. y Mrochek, J.E. (1976) *J. Chromatogr.*, 116, 83.
185. Sen, G.C., y Ghosh, H.P. (1974) *Anal. Biochem.*, 58, 578.
186. Borek, E. (1971) *Cancer Res.*, 31, 596.
187. Fink, K. y Adams, W. (1968) *Arch. Biochem. Biophys.*, 126, 27.
188. Singhal, R. y Cohn, W. (1972) *Anal. Biochem.*, 45, 585.
189. Salas, C.E. y Sellinger, O.Z. (1977) *J. of Chromatogr.*, 133, 231.
190. Werner, E., Kahle, P., Lange, U. y Kroger, H. (1975) *FEBS Letters*, 55, 245.
191. Baguley, B.C. y Staehelin, M. (1968) *Biochemistry*, 7, 45.
192. Baguley, B.C. y Staehelin, M. (1968) *Eur. J. Biochem.*, 6, 1.
193. Spremulli, L.L., Agris, P.F., Brown, G.M. y Rajbhandary, U.L. (1974) *Arch. Biochem. Biophys.*, 162, 22.
194. Hacker, B. (1973) *Polyamines in Normal and Neoplastic Growth*, pp. 55, Raven Press, New York.
195. Leboy, P.S. y Glick, J.M. (1976) *Biochim. Biophys. Acta*, 435, 30.

196. Pegg, A.E. (1972) *Biochim. Biophys. Acta*, 262, 283.
197. Sellinger, O.Z. y Azcurra, J.M. (1974) *Res. Methods in Neurochem.*, Vol. 2, (ed. Marks, N. y Rodnight, R.) pp. 3, Plenum Press, New York.
198. Cummins, C.J. y Glover, R.A. (1977) *J. Anat. (London)*, (in press).
199. Hildesheim, J., Goguillon, J. y Lederer, E. (1973) *FEBS Letters*, 30, 177.
200. Hildesheim, J., Hildesheim, R., Blanchard, P., Farrugia, G. y Michelot, R. (1973) *Biochimie*, 55, 541.
201. Trewyn, R.W. y Kerr, S.J. (1976) *Onco-Developmental Gene Expression*, pp. 101, Academic Press, New York.
202. Young, D.V. y Srinivasan, P.R. (1971) *Biochim. Biophys. Acta*, 238, 447.
203. Cummins, C.J., Salas, C.E. y Sellinger, O.Z. (1975) *Brain Res.*, 96, 407.
204. Hancock, R.L. y Eleftheriou, B.E. (1971) *Physiol. Chem. Physics*, 3, 139.
205. Hacker, B., Hurwitz, C., McDermott, B.J. y Rosano, C.L. (1973) *Physiol. Chem. and Physics*, 5, 491.
206. Moller, M.L., Miller, H.K. y Balis, M.E. (1977) *Biochim. Biophys. Acta*, 474, 435.
207. Wildenauer, D., Gross, H.J. y Riesner, D. (1974) *Nucleic Acids Res.*, 1, 1165.

208. Dainat, J., Salas, C.E. y Sellinger, O.Z. (1977) *Trans. Am. Soc. Neurochem.*, 8, 228.
209. Sellinger, O.Z., Salas, C.E., Dainat, J., Ohlsson, W.G., Zand, R. y de Balbian Verster, F. (1977) *Sixth Int. Soc. Neurochem. (Copenhagen)*.
210. Hancock, R.L. (1968) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 31, 77.
211. Oler, A., Farber, E. y Shull, K.H. (1969) *Biochim. Biophys. Acta*, 190, 161.
212. Villa-Trevino, S., Shull, K.H. y Farber, E. (1966) *J. Biol. Chem.*, 241, 4670.
213. Wainfan, E. y Maschio, F.A. (1975) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 255, 567.
214. Hancock, R.L. y Forrester, P.I. (1973) *Cancer Res.*, 33, 1747.
215. Wilkinson, R. y Pillinger, D.J. (1971) *Int. J. Cancer*, 8, 401.
216. Stewart, B.W. y Pegg, A.E. (1972) *Biochim. Biophys. Acta*, 281, 416.
217. Rajalakshmi, S. (1973) *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 14, 39.
218. Schatz, R.A. y Sellinger, O.Z. (1975) *J. Neurochem.*, 24, 63.
219. Schatz, R.A. y Sellinger, O.Z. (1975) *J. Neurochem.*, 25, 73.

220. De Robertis, E., Sellinger, O.Z., Rodríguez De Lores Arnaiz, G., Alberici, M. y Zieher, L.M. (1967) *J. Neurochem.*, 14, 81.
221. Salas, C.E., Ohlsson, W.G., y Sellinger, O.Z. (1977) *Trans. Am. Soc. Neurochem.*, 8, 180.
222. Salas, C.E., Ohlsson, W.G., y Sellinger, O.Z. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 76, 1107.
223. Schatz, R.A., Vunnam, C.R. y Sellinger, O.Z. (1977) *Neurochem. Res.*, 2, 27.
224. Kerr, S.J. (1974) En *Adv. Enzyme Regulation*, Vol. 13 (ed. Weber, G.) pp. 379, Pergamon Press.
225. Kraus, J. y Staehelin, M. (1974) *Nucleic Acids Res.*, 1, 1455.
226. Kraus, J. y Staehelin, M. (1974) *Nucleic Acids Res.*, 1, 1479.
227. Munns, T.W., Podratz, K.C. y Katzman, P.A. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 58, 496.
228. Clandinin, M.T. y Schultz, G.A. (1975) *J. Mol. Biol.*, 93, 517.
229. Turkington, R.W. (1969) *J. Biol. Chem.*, 244, 5140.
230. Sharma, O.K. y Borek, E. (1970) *Biochemistry*, 9, 2507.
231. Sharma, O.K., Loeb, L.A. y Borek, E. (1971) *Biochim. Biophys. Acta*, 240, 558.
232. Kerr, S.J. y Borek, E. (1972) *Adv. Enzyme Regulation*, 11, 63.

233. Swiatek, K.R., Streeter, D.G. y Simon, L.N. (1971) *Biochemistry*, 10, 2563.
234. Mays, L.L., Borek, E. y Finch, C.E. (1973) *Nature*, 243, 411.
235. Peacock, A.C. y Dingman, C.W. (1967) *Biochemistry*, 6, 1818.
236. Randerath, K., MacKinnon, S.K. y Randerath, E. (1971) *FEBS Letters*, 15, 81.
237. Saborio, J.L. y Aleman, V. (1970) *J. Neurochem.*, 17, 91.