

UCH-FC

Doc-B

V455

MODIFICACION DE RNA POLIMERASA CON
PIRIDOXAL 5'-FOSFATO

Tesis

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Doctor en Ciencias con Mención en Biología

Facultad de Ciencias

por

Alejandro Venegas Esparza

Noviembre, 1976

Patrocinante: Profesor Pablo Valenzuela Valdés

MODIFICATION OF RNA POLYMERASES BY
PYRIDOXAL 5'-PHOSPHATE

AN ABSTRACT

of a dissertation submitted to the Faculty of Sciences
of the University of Chile
in partial fulfillment of the requirements for the degree of
Doctor en Ciencias con Mención en Biología

by

Héctor Alejandro Venegas Esparza

November, 1976

Dissertation supervisor: Professor Pablo Valenzuela Valdés

Facultad de Ciencias

Universidad de Chile

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;

HECTOR ALEJANDRO VENEGAS ESPARZA

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de Tesis para el grado de Doctor en Ciencias con Mención en Biología en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 23 de Noviembre de 1976.

Patrocinante de Tesis

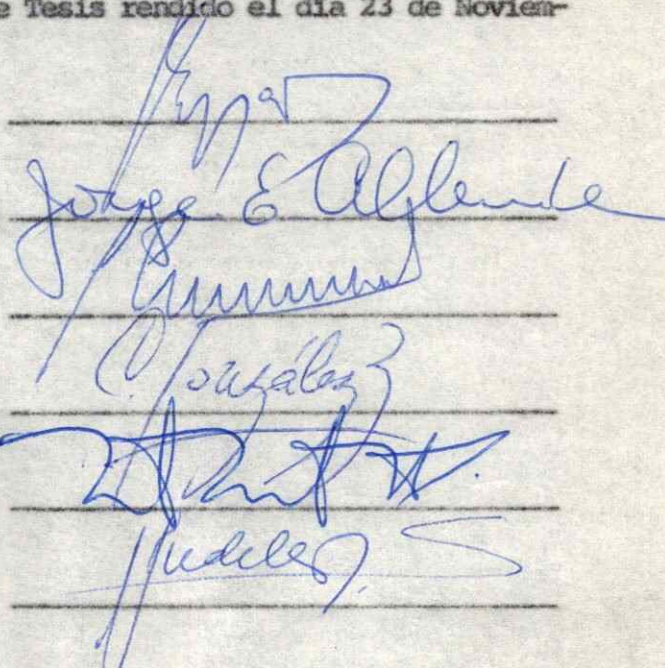
Comisión Informante de Tesis
Dr. Jorge Allende

Comisión Informante de Tesis
Dr. Luis Corcuera

Comisión Informante de Tesis
Dra. Carmen González

Comisión Informante de Tesis
Dr. Tito Ureta

Comisión Informante de Tesis
Dr. Arturo Yudelevich


The right side of the document features six horizontal lines, each corresponding to a member of the thesis committee. Each line is signed with a handwritten signature in blue ink. From top to bottom, the signatures are: a stylized signature, 'Jorge E. Allende', 'Luis Corcuera', 'Carmen González', 'Tito Ureta', and 'Arturo Yudelevich'.

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Bioquímica del Departamento de Biología Celular del Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad Católica de Chile, bajo la dirección del Dr. Pablo Valenzuela Valdés.

AGRADECIMIENTOS

Expreso mis agradecimientos a las siguientes personas, cuyo aporte ha sido de gran ayuda durante el desarrollo de esta tesis:

Al Dr. Pablo Valenzuela, por el extenso aporte de ideas, información bibliográfica y ayuda en la revisión de los escritos.

Al Dr. Jaime Eyzaguirre, por las facilidades otorgadas en el Laboratorio de Bioquímica.

A los Bioquímicos, Srtas. Paulina Bull, Josefina Zaldívar y Margarita Quiroga, cuyos aportes en el desarrollo experimental del trabajo fueron de gran valor.

A la Srta. María Angélica Medina, por su eficiencia y excelente cooperación en la transcripción de los manuscritos.

A todas las personas del laboratorio, que de un modo u otro, ayudaron a la materialización de este trabajo.

H. Alejandro Venegas E.

Santiago, Noviembre de 1976

Dedico esta Tesis
A MI ESPOSA Y PADRES

TABLA DE CONTENIDOS

	Pág.
LISTA DE TABLAS	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS	XII
RESUMEN	XIV
ABSTRACT	XVII
INTRODUCCION	1
METODOS Y MATERIALES	
I. METODOS	
A. Ensayo de la actividad RNA polimerásica.	11
1. Medio de incubación para la enzima de <u>E. coli</u>	12
2. Medio de incubación para la enzima I de levaduras	12
3. Medio de incubación para las enzimas I y II de hígado de rata.....	13
B. Ensayo de unión de RNA polimerasas a DNA	13
C. Ensayo de iniciación de la síntesis de RNA	14
D. Ensayo de unión de PLP a RNA polimerasas	
1. Método espectrofotométrico.....	16
2. Método radiactivo	18
E. Purificación de las enzimas	
1. RNA polimerasa de <u>E. coli</u>	20

1.1. Método de Berg y col.	21
1.2. Método de Burgess y Jendrisak.....	25
2. RNA polimerasa de hígado de rata	28
3. RNA polimerasa I de levaduras	30
F. Experimentos cinéticos	
1. Inactivación por PLP y análogos	34
2. Efecto del pH, concentración de PLP y fuerza iónica en la reacción de inactiva ción	35
3. Efectos de temperatura, aminas, NaBH_4 , sustratos y DNA en la reacción de inacti vación por PLP	36
4. Análisis espectrofotométrico de formación de base de Schiff	37
G. Preparación de DNA	
1. DNA de bacteriófago T_4	37
2. DNA- ^3H de células de hepatoma de rata (DNA- ^3F de HTC)	41
H. Preparación de DNA-celulosa	42
I. Preparación de PLP- ^3H	43
J. Preparación de N- ϵ -piridoxil-lisina	49
K. Electroforesis de alto voltaje	50
L. Cromatografía en papel	51
M. Electroforesis en geles de poliacrilamida .	52
N. Fluorografía	54

	Pág.
N. Medición de radiactividad.....	56
O. Determinación de proteínas.....	56
 II. MATERIALES	
A. Material biológico.....	58
B. Proteínas.....	58
C. Reactivos.....	58
D. Materiales cromatográficos.....	60
 RESULTADOS	
A. Inhibición de las RNA polimerasas por pi- ridoxal 5'-fosfato y análogos.....	61
B. Evidencias de formación de base de Schiff en la reacción de inactivación por PLP	
1. Reversión por aminas y reducción con NaBH ₄	67
2. Espectros de absorción de los productos de reacción entre PLP y RNA polimerasas	70
C. Estudios cinéticos de la reacción entre PLP y RNA polimerasa de <u>E. coli</u>	73
1. Efecto de la concentración de PLP.....	77
2. Efecto del pH.....	78
3. Efecto de fuerza iónica.....	82
4. Efecto de la temperatura en la reac- ción de modificación y efecto del tipo de DNA usado en el ensayo de activi- dad residual.....	84

D. Determinación espectrofotométrica de la cinética de formación de base de Schiff	
1. Reacción entre PLP y RNA polimerasa de <u>E. coli</u>	87
2. Reacción entre PLP y DNA, sustratos y otros compuestos con grupos amino.....	89
E. Identificación de los residuos de la RNA polimerasa modificados por PLP.....	91
F. Efecto de la modificación con PLP sobre la estructura cuaternaria de las RNA polimerasas.....	94
G. Existencia de dos poblaciones de grupos amino en RNA polimerasa.....	95
1. Efecto discriminatorio de la inactivación con PLP 1 mM sobre la RNA polimerasa de <u>E. coli</u>	95
2. Número de residuos de lisina de cada población.....	100
3. Moles de PLP incorporados en RNA polimerasa I de levaduras.....	104
H. Efecto de la modificación por PLP sobre algunas etapas parciales de la síntesis de RNA.....	104
1. Unión a DNA.....	106
2. Iniciación de la síntesis de RNA.....	110

	Pág.
I. Estudios de protección de la modificación por PLP	
1. Protección medida por ensayo de actividad total.....	116
2. Protección medida frente a la incorporación de PLP- ³ H en la RNA polimerasa de <u>E. coli</u>	124
J. Marcación de las subunidades de las enzimas con PLP	
1. RNA polimerasa de E. coli.....	129
2. RNA polimerasa I de levaduras.....	133

DISCUSION

A. Evidencias cinéticas preliminares de la reacción entre RNA polimerasa de <u>E. coli</u> y PLP.....	136
B. Formación de base de Schiff en la reacción de inactivación.....	139
C. Análisis estructural de las enzimas modificadas. Identificación de N- ϵ -piridoxil-lisina.....	140
D. Dos clases de residuos ϵ -amino de lisina en RNA polimerasas.....	141
E. Rol de grupos amino en la catálisis. Estudio de las reacciones parciales.....	144
F. Estudios de protección por DNA, sustratos y antibióticos.....	148

	Pág.
G. Marcación de las subunidades de las enzimas con PLP.....	154
H. Características del sitio activo de RNA po- limerasas. Posible analogía entre procarion <u>es</u> y eucariontes.....	156
BIBLIOGRAFIA.....	165
APENDICE.....	175

LISTA DE TABLAS

	Pág.
TABLA 1 Valores de las constantes de velocidad para la reacción de inactivación por PLP de la RNA polimerasa de <u>E. coli</u>	80
TABLA 2 Iniciación de la síntesis de RNA. Reacción de intercambio de $^{32}\text{PP}_i$ dirigida por poli d(AT) y con ATP como sustrato iniciador....	114
TABLA 3 Iniciación de la síntesis de RNA. Reacción de intercambio de $^{32}\text{PP}_i$, catalizada por la RNA polimerasa de <u>E. coli</u> , dirigida por poli d(AT) y con ADP como sustrato iniciador	117
TABLA 4 Efecto de nucleótidos y DNA en la cinética de inactivación de la RNA polimerasa de <u>E. coli</u> con PLP.....	123
TABLA 5 Efecto de nucleótidos y DNA en la cinética de inactivación de la RNA polimerasa I de levaduras con PLP.....	125

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Fig. 1. Purificación de PLP- ³ H. Cromatografía de intercambio iónico.....	46
Fig. 2. Identificación y pureza del PLP- ³ H.....	48
Fig. 3. Cinética de inactivación de la RNA polimerasa de <u>E. coli</u> con diferentes concentraciones de PLP.....	62
Fig. 4. Cinética de inactivación de la RNA polimerasa I de levaduras con diferentes concentraciones de PLP y análogos piridoxal (PL) y piridoxamina 5'-fosfato (PAP).....	63
Fig. 5. Cinética de inactivación de la RNA polimerasa I de hígado de rata con diferentes concentraciones de PLP, PL y PAP.....	64
Fig. 6. Cinética de inactivación de la RNA polimerasa II de hígado de rata.....	65
Fig. 7. Cinética de inactivación de la RNA polimerasa de <u>E. coli</u> con análogos de PLP.....	66
Fig. 8. Efecto de NaBH ₄ y Tris-HCl en la cinética de inactivación de la RNA polimerasa de <u>E. coli</u> con PLP.....	68
Fig. 9. Efecto de NaBH ₄ y aminas en la cinética de inactivación de las RNA polimerasas I y II de hígado de rata con PLP.....	69
Fig. 10. Espectros de diferencia de complejos entre RNA polimerasa de <u>E. coli</u> y PLP antes y después de reducir con NaBH ₄	71
Fig. 11. Espectros de diferencia de complejos entre RNA polimerasa I de levaduras y PLP antes y después de reducir con NaBH ₄	72
Fig. 12. Efecto de la concentración de PLP en la velocidad de inactivación de la RNA polimerasa de <u>E. coli</u>	74

Fig. 13. Cinética de inactivación de la RNA polimerasa de <u>E. coli</u> con PLP 0,1 mM a diferentes pH.....	75
Fig. 14. Gráficos de pseudo primer orden para la inactivación de la RNA polimerasa de <u>E. coli</u> con PLP 0,1 mM a diferentes pH.....	76
Fig. 15. Efecto del pH en la constante de velocidad observada (k_{obs}) para la reacción de inactivación de la RNA polimerasa de <u>E. coli</u> con PLP 0,1 mM.....	81
Fig. 16. Efecto de la fuerza iónica en la k_{obs} de la reacción de inactivación de la RNA polimerasa de <u>E. coli</u> con PLP 0,1 mM.....	83
Fig. 17. Cinética de inactivación de la RNA polimerasa de <u>E. coli</u> con PLP 0,1 mM a distintas temperaturas.....	85
Fig. 18. Cinética de inactivación de la RNA polimerasa de <u>E. coli</u> con PLP 0,1 mM usando diferentes polinucleótidos en el ensayo de actividad residual.....	86
Fig. 19. Cinética de formación de base de Schiff entre PLP y RNA polimerasa de <u>E. coli</u>	88
Fig. 20. Cinética espectrofotométrica de la reacción entre PLP y DNA, sustratos y otros compuestos con grupos amino.....	90
Fig. 21. Identificación de N- ϵ -piridoxil-lisina como el residuo aminoacídico de RNA polimerasa de <u>E. coli</u> modificado por PLP.....	92
Fig. 22. Identificación de N- ϵ -piridoxil-lisina como el residuo aminoacídico de la RNA polimerasa I de levaduras modificado por PLP.....	93
Fig. 23. Efecto de la modificación con PLP sobre la estructura cuaternaria de la RNA polimerasa de <u>E. coli</u>	96
Fig. 24. Efecto de la modificación con PLP sobre la estructura cuaternaria de la RNA polimerasa I de levaduras.....	97

Fig. 25. Efecto discriminatorio de la inactivación con PLP 0,1 mM sobre la RNA polimerasa de <u>E. coli</u> . Cinéticas de inactivación para ensayos de actividad enzimática y unión a DNA...	99
Fig. 26. Determinación del número de moles de PLP- ³ H unidos a la RNA polimerasa de <u>E. coli</u> que anulan la actividad de síntesis de RNA y la unión a DNA.....	102
Fig. 27. Determinación espectrofotométrica del número de moles de PLP incorporados en la RNA polimerasa de <u>E. coli</u> que la inactivan completamente.....	103
Fig. 28. Determinación del número de moles de PLP incorporados en la RNA polimerasa I de levaduras que la inactivan completamente.....	105
Fig. 29. Unión a poli d(AT)- ³ H de la RNA polimerasa de <u>E. coli</u> modificada con PLP.....	108
Fig. 30. Unión a DNA- ³ H de HTC, de la RNA polimerasa de <u>E. coli</u> modificada con PLP.....	109
Fig. 31. Unión a DNA- ³ H de HTC, de la RNA polimerasa I de levaduras modificada con PLP.....	111
Fig. 32. Unión a DNA- ³ H de HTC, de la RNA polimerasa de <u>E. coli</u> modificada con PLP a pH 10,56....	112
Fig. 33. Efecto del DNA del bacteriófago T ₄ en la cinética de inactivación de la RNA polimerasa de <u>E. coli</u> con PLP.....	119
Fig. 34. Efecto del DNA de timo de ternera en la cinética de inactivación de la RNA polimerasa de <u>E. coli</u> con PLP.....	120
Fig. 35. Efecto protector de poli d(AT) , ATP y UTP en el ensayo de unión de PLP- ³ H a la RNA polimerasa de <u>E. coli</u>	126
Fig. 36. Efecto de Rifampicina y AF/O13 en la unión de PLP- ³ H a la RNA polimerasa de <u>E. coli</u>	128
Fig. 37. Marcación de subunidades de la RNA polimerasa de <u>E. coli</u> con PLP 0,1 mM y NaB ³ H ₄	131

	Pág.
Fig. 38. Marcación de las subunidades ₃ de la RNA polimerasa de <u>E. coli</u> con PLP- ³ H.....	132
Fig. 39. Marcación de las subunidades de la RNA polimerasa I de levaduras con PLP y NaB- ³ H ₄	134
Fig. 40. Modelo del sitio activo de la RNA polimerasa de <u>E. coli</u>	161

ADREVIATURAS

AF/013	: O-n-octil-oxima de 3-formil rifampicina SV
Aquacide II	: polietilenglicol de peso molecular 250.000
A_t	: % de actividad residual a tiempo t
A_{∞}	: % de actividad residual a tiempo infinito
BBB	: barbital-HCl 20 mM pH 8,0, $MgCl_2$ 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA 0.1 mM, 2-mercaptoetanol 10 mM
BGMED	: barbital-HCl 20 mM pH 8,0, $MgCl_2$ 10 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 0,1 mM, glicerol 5%
BSA	: albúmina sérica de bovino
DEAE	: dietilaminoetil
DMSO	: dimetilsulfóxido
DTT	: ditiotreitol
EDTA	: ácido etilendiaminotetra-acético
HTC	: células de tumor hepático de rata
PA	: piridoxina
PAP	: piridoxamina 5'-fosfato
PL	: piridoxal
PLP	: piridoxal 5'-fosfato
poli A	: poliribonucleotido de ácido adenílico

poli d(AT) : heteropolinucleótido sintético de doble
hebra compuesto de unidades alternadas de
ácido desoxi(adenílico-timidílico)

polimina P : polietilenimina

POPOP : 1,4-bis-2-(5-feniloxazolil)benceno

POP : 2,5 difeniloxazol

SDS : dodecil sulfato de sodio

TCA : ácido tricloroacético

RESUMEN

En esta tesis se ha iniciado un estudio del sitio activo de las RNA polimerasas, con el fin de comprender el mecanismo de la reacción que catalizan.

Se ha detectado la presencia de grupos amino en el sitio activo de estas enzimas, por modificación química con piridoxal 5'-fosfato (PLP).

La reacción de modificación resultó ser bastante selectiva si se compara el efecto de PLP y sus análogos en la inactivación de las RNA polimerasas. El uso de este reactivo permitió un análisis del rol de grupos amino de estas enzimas en el proceso de transcripción. La reacción de inactivación involucra la formación de una base de Schiff, en base a datos espectrales, reversión de la inactivación y reducción con NaBH_4 . Un estudio cinético de esta reacción con la enzima de E. coli en función del pH permitió suponer la participación de un grupo amino de pK_a 7,9. La hidrólisis ácida total de las enzimas modificadas reveló que sólo el ϵ -amino de lisina reacciona con PLP.

El análisis de algunas etapas parciales de la síntesis de RNA catalizadas por estas enzimas permitió establecer una dualidad de efectos frente a la modificación con PLP. A bajas concentraciones de PLP (cercasas a 0,1 mM) se modifican sólo unos pocos residuos de lisina (1 a 2 en la enzima de E. coli y 3-4 en la de levadura) que afectan fundamentalmente la etapa de iniciación de la síntesis de RNA. Con altas concentraciones de PLP

(alrededor de 1 mM) se modifican varios grupos amino (aproximadamente 24 grupos en la enzima bacteriana) lo que afecta fuertemente la capacidad de la enzima para unirse a DNA o poli d(AT). Esto indica el diferente rol de grupos amino de las RNA polimerasas en el proceso de transcripción.

Estudios de protección con DNA y sustratos frente a la inactivación más selectiva de las enzimas, medida ya sea por actividad residual o por incorporación de PLP- ^3H , sugieren la localización de estos grupos amino en el sitio de iniciación de la síntesis de RNA, definido previamente en la enzima de E. coli (subunidad β). Los ensayos de intercambio de $^{32}\text{PP}_i$ con el segundo nucleótido incorporado, apoyan esta idea, indicando que la iniciación de la síntesis de RNA está seriamente afectada. En estas condiciones la marcación de las subunidades de la enzima de E. coli con PLP- ^3H , o bien, reduciendo con $\text{NaB-}^3\text{H}_4$ revela incorporación en las subunidades β' , β y α . Este resultado no permite distinguir cuál subunidad posee el residuo realmente importante en la inactivación, ya que no fue posible resolver claramente la marcación entre β y β' . Además, la marcación de la subunidad α , para la cual no se ha descrito una función directa en la catálisis, complica la interpretación de estos resultados. Una explicación satisfactoria para esto reside en la **presencia** de sitios de unión de ATP en la subunidad α , los que podrían ser reconocidos por PLP y no revelan una importancia fundamental en el ensayo in vitro. En contraste, la marcación de las subunidades de la enzima I de levaduras, que tiene una estructura cuaternaria complejísima (11 subunidades

distintas) es más concluyente, ya que sólo se modifican 3 subunidades, de las cuales, sólo una (la de peso molecular 180.000) manifiesta una incorporación selectivamente reducida al proteger con sustratos frente a la inactivación con PLP. Este hecho, además del efecto de reducción de la reacción de intercambio de $^{32}\text{PP}_i$ que provoca esta modificación sugieren que el asiento estructural para el sitio catalítico en la RNA polimerasa I de levaduras reside en la subunidad de 180.000.

Se propone un modelo para el sitio activo de la RNA polimerasa bacteriana que incluye esencialmente: 1) un sitio de unión para el DNA con la participación de varios residuos ξ -amino de lisina con valores de pK_a normales (10,5); 2) un sitio de iniciación con al menos un grupo ξ -amino de lisina de pK_a 7,9 y 3) un sitio de elongación.

Se discuten probables analogías de los sitios activos de las enzimas procarióticas y eucarióticas, en base a la participación de lisinas en la unión del DNA y en el sitio de iniciación.

ABSTRACT

In this work, a study of the active site of E. coli and yeast RNA polymerases has been initiated, in order to understand the mechanism of the reaction they catalize.

The presence of amino groups in the active site of these enzymes has been detected by chemical modification with pyridoxal 5'-phosphate (PLP).

The modification reaction was very selective, as can be deduced from the effects of PLP and some analogues on the activity of the RNA polymerases. The use of this reactive made possible an analysis of the role of the amino groups of these enzymes on the process of transcription. The modification implies formation of a Schiff base, as shown by spectral data, reversion of the inactivation and reduction with NaBH_4 . A kinetic analysis of this reaction as a function of pH, with the E. coli enzyme suggests the participation of an amino group of pK_a 7.9. Total acid hydrolysis of the modified enzymes showed that only ϵ -amino groups of lysine are modified by PLP.

The analysis of some partial steps of RNA synthesis catalyzed by these enzymes showed a dual effect of PLP in relation to the modification reaction. Low concentrations of PLP (about 0,1 mM) modify only few lysine residues (1-2 in the E. coli enzyme and 3-4 in yeast RNA polymerase I) which affect only the initiation step in RNA synthesis. High concentrations of PLP (about 1 mM)

modify several amino groups (nearly 24 groups in the bacterial enzyme) affecting strongly the enzyme binding to DNA or poly d(AT). This points out the different roles of RNA polymerase amino groups in transcription.

Studies of DNA and substrate protection as measured by residual activity or directly by PLP-³H incorporation, supports the suggestion that these few amino groups are needed at the initiation site of RNA synthesis.

Additional supporting evidence is obtained with exchange assays of ³²PP_i with poly d(AT) as template, showing that initiation of RNA synthesis is seriously affected. Under the same experimental conditions, the labelling by PLP-³H or the reduction with NaB-³H₄ shows incorporation into the β', β and α subunits of the E. coli enzyme.

This result does not allow to establish which of these subunits has the important residues participating in the inactivation reaction because it was not possible to resolve β from β'. Besides, the labelling of the α subunit complicates the interpretation of the results, since no direct participation of this subunit in the catalysis has, so far, been described.

A satisfactory explanation for this, resides in the existence of ATP binding sites on the α subunit which can be recognized by PLP. These sites may not be important for the in vitro enzymatic assay. In contrast, labelling of the subunits of yeast RNA polymerase I, an enzyme which has a complicated quaternary structure (11 different subunits) is more conclusive: only 3 subunits are modified, and from these, only one (molecular

weight 180.000) shows a selective incorporation which can be reduced by protection with substrates. This fact, besides the drop in $^{32}\text{PP}_i$ exchange reaction that this modification produces, suggests that the basic structure of the catalytic site of the yeast RNA polymerase I resides on this subunit.

A model for the active site of bacterial RNA polymerase is proposed. This model includes: 1) A DNA-binding site with the participation of several lysine ϵ -amino groups having normal pK_a values (10.5); 2) An initiation site with at least one lysine ϵ -amino having a pK_a of 7.9 and 3) An elongation site.

Possible analogies between the active sites of prokaryotic and eukaryotic RNA polymerases are discussed, based on the participation of lysine in the binding of DNA and in the initiation site.

INTRODUCCION

La RNA polimerasa dependiente de DNA (RNA nucleotidil transferasa E.C. 2.7.7.6) cataliza la síntesis de RNA a partir de un molde de DNA y de los ribonucleósidos trifosfato correspondientes. Esta enzima fue detectada inicialmente en hígado de rata por S. Weiss en 1960 (1) y al año siguiente Hurwitz y col. la describieron en células bacterianas (2). Estos hallazgos, junto con la hipótesis del RNA mensajero de Jacob y Monod (3) en el proceso de biosíntesis de proteínas iniciaron uno de los grandes avances de la Biología Molecular moderna.

La RNA polimerasa tiene un rol importante en el proceso denominado transcripción que corresponde a la expresión del lenguaje informacional contenido en el DNA, en una forma metabólicamente más adecuada, el RNA. Este material es heterogéneo por la diversidad de información que contiene; parte de él es traducido y se expresa en proteínas con roles estructurales, catalíticos o regulatorios de importancia fundamental para la expresión de vida de todo organismo.

La importancia del fenómeno de transcripción está asentada en la extensión y diversidad de los procesos que dependen de él. Conviene recordar que la síntesis de RNA debe ocurrir en procesos como replicación del DNA, biosíntesis de proteínas, siendo por lo tanto clave en morfogénesis, diferenciación celular, desarrollo embrionario e incluso en procesos patológicos como

neoplasia donde su importancia es ampliamente reconocida.

La RNA polimerasa permite la síntesis de RNA a partir de un molde de DNA, catalizando la incorporación de ribonucleótidos complementarios a las bases nucleotídicas existentes en el DNA siguiendo las reglas propuestas por Watson y Crick (4). El proceso químico principal consiste en la formación de enlaces fosfodiéster entre la posición 3' del OH de la ribosa del nucleótido inicial con el fosfato en posición 5', aportado por el segundo nucleótido entrante que simultáneamente aparea con la base complementaria contenida en el DNA. Este proceso se repite varias veces hasta terminar una secuencia específica que puede ser procesada posteriormente.

En los últimos años se han desarrollado numerosas técnicas analíticas que han permitido el estudio estructural de diversas macromoléculas. Esto ha facilitado el análisis de las polimerasas provenientes de microorganismos (5) y muy recientemente las de organismos superiores (6,7). La RNA polimerasa está presente en seres tan simples como los bacteriófagos del tipo T₃, (8) y T₇ donde su complejidad estructural se reduce solo a una cadena polipeptídica de peso molecular elevado (9). En otros fagos aparece estructurada en forma cooperativa, es decir, con aporte viral y bacteriano, como se ha descrito en los procesos de infección por bacteriófagos del tipo T₄ (10) y SP01 (11,12).

El sistema transcripcional en bacterias ha sido estudiado exhaustivamente, especialmente en E. coli (5). La enzima

proveniente de esta fuente ha sido purificada hasta homogeneidad por varios métodos (13-16). Estudios de su estructura han permitido establecer la existencia de al menos 5 subunidades diferentes denominadas β' , β , σ ; α y ω con una relación estequiométrica de $\beta'\beta\alpha_2\sigma\omega_{0,5}$ (5). Los pesos moleculares de estas subunidades han sido determinados por varios métodos y se describen los siguientes valores: β' , 150.000-165.000; β , 145.000-155.000; σ , 85.000-95.000; α , 39.000-41.000 y ω , 9.000-12.000. La subunidad sigma no es imprescindible para la actividad de la enzima pero confiere especificidad a la transcripción (17).

El sistema transcripcional bacteriano es complicado. Aunque se ha descrito sólo una enzima como responsable de la síntesis de todo el RNA celular, aparecen alteraciones estructurales importantes en la polimerasa durante los procesos de infección por bacteriófagos (18,19) como también la síntesis de nuevas subunidades en los cambios sufridos durante la esporogénesis (20). Además, recientemente se ha aislado de E. coli una RNA polimerasa estructuralmente diferente de la antes comentada que tendría una función muy específica en el proceso de replicación del DNA (21). Aparte de la enzima, esta maquinaria transcripcional en sí misma es compleja por el gran número de componentes que participan en la síntesis de RNA. Se requiere de DNA como molde, los 4 ribonucleósidos trifosfato ATP, GTP, CTP y UTP, los cofactores Mg^{2+} o Mn^{2+} y algunos factores transcripcionales que confieren selectividad al proceso in vivo (5).

Recientemente se ha iniciado el estudio de mecanismo de control de síntesis de RNA, a nivel molecular, utilizando ciertas unidades transcripcionales definidas, entre ellos, los operones lac y trip de E. coli (22-24) y el operon responsable de la síntesis de histidina de Salmonella (25). Este mismo avance no se ha logrado en organismos superiores, los que por su inherente complejidad han insinuado poseer sistemas transcripcionales mucho más difíciles de analizar.

Las células de eucariontes poseen múltiples RNA polimerasas. Tres formas (I, II y III) fueron originalmente descritas en levaduras (26), erizo de mar (27) e hígado de rata (27) en base a sus distintas propiedades, principalmente su diferente elución de una columna de DEAE-Sephadex. RNA polimerasa I está localizada en el nucléolo (28) y parece estar involucrada en la síntesis de RNA ribosomal (29). RNA polimerasa II es nucleoplásmica y sería responsable de la síntesis de RNA nuclear heterogéneo, presumiblemente RNA mensajero (30). RNA polimerasa III, de origen nucleoplásmico, es eluída de DEAE-Sephadex con altas concentraciones de sal y parece ser responsable de la síntesis de t-RNA y RNA ribosomal de 5 S (31). La demostración más clara de la existencia de tres RNA polimerasas diferentes en eucariontes la constituye la comparación directa de la estructura cuaternaria de estas enzimas en una misma especie o tejido. Estos estudios se han realizado con las RNA polimerasas de células tumorales MOPC₃₁₅ (plasmacitoma de rata) (32) y levaduras (33)

y han demostrado que cada enzima posee una estructura de subunidades diferente.

Una de las mayores dificultades encontradas inicialmente en el estudio de RNA polimerasas de eucariontes fue la falta de métodos de purificación adecuados que permitieran una solubilización eficiente de las enzimas que normalmente están unidas a la cromatina y la falta de condiciones óptimas para la estabilización de estas enzimas (34). Una dificultad insalvable es que, salvo células tumorales (35,36) y levaduras (33,37), las células eucarióticas contienen bajas cantidades de RNA polimerasas (38,39). En la actualidad se han descrito métodos de purificación adecuados para la purificación y estudios estructurales de enzimas de timo de ternera (40,41), plasmacitoma de rata MOPC₃₁₅ (32,36,39) y levadura (33,42-44). Además de las enzimas de levaduras y MOPC₃₁₅ también se ha estudiado detalladamente la composición de subunidades de las enzimas de timo de ternera (40,41) oviducto de gallina (45) y de otras fuentes (6). En todos los casos se ha encontrado que las enzimas poseen una estructura muy compleja formada por múltiples subunidades de variados pesos moleculares. No se conoce aún la función de cada una de estas proteínas y en varios casos aún no es claro si son realmente parte de la enzima o simples contaminantes (46).

Una de las maneras de ahondar en el mecanismo de RNA polimerasa y por lo tanto la relación de éste con la selectividad de la transcripción, es el estudio del sitio activo de estas

enzimas. Este conocimiento puede además ser útil para descubrir la función de cada una de las subunidades.

En sistemas bacterianos (E. coli) se ha propuesto que la enzima interacciona con algunos factores transcripcionales que cambian la selectividad del proceso y como el volumen informacional en bacterias es pequeño, la selectividad transcripcional requerida podría explicarse en parte de este modo. Sin embargo, ya en seres un poco más evolucionados como levadura y en general organismos superiores, es necesario recurrir a otras explicaciones que puedan dar cuenta de la selectividad. Si bien las enzimas de eucariontes tienen cierta analogía estructural en cuanto a subunidades con respecto a su contraparte bacteriana, aparecen varias subunidades de pequeño tamaño cuyo rol se desconoce aún. ¿No podría ser una buena explicación que algunas de esas subunidades presentes en las enzimas eucarióticas sean un asiento estructural para conferir selectividad a las enzimas por interacción con otros factores aún no descubiertos cuya función sea tan refinada que ha sido imposible detectarlos a la fecha?

Por ello, ha sido de interés estudiar inicialmente en forma comparativa los sitios activos de ellas y este ha sido el trabajo desarrollado principalmente en esta tesis.

Interesa primordialmente definir ciertos aspectos estructurales del sitio activo, tales como ubicar la(s) subunidad(es) que constituyen el asiento físico del mismo y los residuos aminoacídicos

necesarios para la actividad polimerásica, el probable mecanismo de como ocurre la catálisis y con ellos inferir las posibles formas de interacción que expliquen cambios de selectividad en la transcripción.

Existen varias formas para abordar un estudio del sitio activo:

- a) Desde un punto de vista genético, aislando mutantes que posean una alteración funcional definida en el sistema transcripcional. Esta herramienta analítica es sólo factible de usar en bacterias y probablemente con levadura que son organismos relativamente simples en los cuáles es posible realizar manipulaciones genéticas. A la fecha se han aislado mutantes de E. coli que son resistentes a antibióticos tales como rifampicina (47-49) y estreptolidigina (50). Se ha establecido que estas mutantes tienen alterada la subunidad β (47,49) y es este polipéptido de la enzima el que interactúa con estos antibióticos. También se ha encontrado un mutante termosensible que tienen la subunidad β' alterada (51). Recientemente se han descrito mutantes de RNA polimerasa de levaduras sensibles a la temperatura las que aún no se han caracterizado en detalle (52). En eucariontes superiores se han aislado mutantes resistentes a α -amanitina, un inhibidor selectivo de la RNA polimerasa II (53,54), a partir de células en cultivo de ovario de Hamster (55).

- b) Análisis estructural con el objeto de ubicar topográficamente el sitio activo de las enzimas. Esta empresa resulta extremadamente difícil y larga, ya que requiere del conocimiento de la estructura primaria de los polipéptidos que conforman las enzimas, como también de la distribución tridimensional de los residuos aminoacídicos para lograr delimitar los residuos pertenecientes al sitio activo. Los trabajos de secuencia aminoacídica están recién comenzando en la enzima bacteriana y aunque se ha logrado la cristalización de esta enzima (56) no ha sido posible resolver su estructura fina mediante el análisis de difracción de rayos X debido a su complejidad estructural. Este método resulta por el momento aún menos adecuado para aplicarlo a las enzimas de eucariontes.
- c) Modificación química del sitio activo. Aunque resulta más indirecto, es posible de este modo ubicar aquellos residuos implicados directamente en la catálisis enzimática. Esta ha sido una herramienta utilizada ampliamente para estudiar los sitios activos de varias enzimas (57). Esta técnica permite variaciones más elaboradas como la denominada marcación por afinidad (58). Se ha elegido esta forma de abordar un estudio del sitio activo de las RNA polimerasas porque es la más factible de aplicar a las enzimas de organismos superiores y lograr un estudio comparativo de ellas. Gran parte de la información existente respecto

al sitio de la enzima bacteriana se ha logrado mediante esta metódica.

La RNA polimerasa de E. coli, la más estudiada en este aspecto, posee presumiblemente en su sitio activo, varios residuos aminoacídicos que al parecer son importantes para la función enzimática:

- a) Grupos amino. Los trabajos de Ishihama y Hurwitz (59) fueron los primeros en indicar su importancia. Posteriormente los trabajos de Nixon y col. (60) y de Wu y col. (61) también indicaron la participación de un residuo ϵ -amino de lisina en la actividad catalítica.
- b) Residuos de histidina. Su modificación por fotooxidación con Rosa de Bengala causa incapacidad de catalizar la formación de enlaces fosfodiéster, aunque las etapas previas de la reacción no se ven alteradas (59). Estudios posteriores han permitido detectar una inhibición de la síntesis de RNA no ligada a fotooxidación de histidina utilizando este mismo modificador (62).
- c) Residuos de cisteína. Aunque su estudio ha sido bastante exhaustivo, los resultados de los autores difieren en cuanto a si su rol más importante está ligado a la catálisis propiamente tal (63) o a mantener la conformación activa de la enzima (64).

En este trabajo se ha recurrido a piridoxal 5'-fosfato como reactivo modificador de grupos amino de las RNA polimerasas

de diversas fuentes en un esfuerzo por analizar la naturaleza del sitio activo y establecer algún grado de homología de los sitios activos que permita sustentar una hipótesis de mecanismo de reacción similar en todas las RNA polimerasas. Se escogió este compuesto porque posee un grupo fosfato que puede dirigirlo hacia el sitio de unión de grupos fosfato en el centro activo de las polimerasas, y además, porque la presencia de un grupo aldehído muy reactivo en su molécula permitiría la reacción con algún grupo amino cercano al sitio activo o involucrado en la catálisis. Además, la característica estructural de este aldehído lo asemeja a algunos de los sustratos nucleotídicos que participan en la reacción. El PLP ha sido usado en varias otras enzimas como reactivo dirigido hacia el sitio de unión de fosfato (65-68).

En este trabajo se demuestra que todas las RNA polimerasas analizadas son inhibidas por piridoxal 5'-fosfato y tienen una población de grupos amino susceptibles de modificarse que alteran una o más etapas de la reacción total de síntesis de RNA. En general los resultados demuestran cierta similitud en los sitios activos de las enzimas y corroboran la analogía estructural respecto a las subunidades, antes comentada, e indican que el requerimiento de grupos amino en su actividad catalítica parece ser general.

METODOS Y MATERIALES

I. METODOS

A. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD RNA POLIMERASICA

La actividad RNA polimerásica se determina midiendo la incorporación de tritio de un nucleótido, usualmente UTP-³H, en el RNA sintetizado. Como moldes se utilizan generalmente DNA de bacteriófago T₄ y poli d(AT) para la enzima de E. coli y DNA de timo de ternera para las enzimas de otras fuentes. Luego de incubar la enzima, cofactores y sustratos por 5-10 minutos (tiempo durante el cual la formación de producto demostró ser linealmente dependiente de éste) el RNA formado se separa del remanente de nucleótidos libres. Una alícuota de 0,05 ml de la mezcla de incubación se empapa directamente sobre discos de papel de DEAE-celulosa (Whatman DE-81) de 2,5 cm de diámetro. Se logra una elución selectiva de los mononucleótidos retenidos en los discos, mediante 7 lavados con aproximadamente 150-200 ml cada vez (para 40 discos simultáneamente) de K₂HPO₄ al 4%. El exceso de fosfato se elimina con 2 lavados de agua con volúmenes similares. Finalmente se lava 2 veces con etanol al 95% para permitir un secado rápido bajo luz infrarroja. La actividad retenida en los filtros se mide en un contador de centelleo líquido. Los medios de incubación son diferentes, según la enzima provenga de E. coli, levaduras o hígado de rata.

1. Medio de incubación para la enzima de E. coli

Contiene, en un volumen final de 0,06 ml, barbital-HCl 20 mM; glicerol 5%; KCl 100 mM; MgCl₂ 20 mM; ATP, GTP y CTP 1 mM cada uno; UTP 0,3 mM; UTP-³H 1,0 μCi; 2-mercaptoetanol 10 mM; EDTA 0,1 mM, DTT 2,5 mM; y 8,8 μg de DNA de bacteriófago T₄ o 10 μg de DNA de timo de ternera u 8 μg de poli d(AT). El pH final de la mezcla es 8,0. La mezcla se preincuba 2 minutos a la temperatura de ensayo previo a la adición de enzima. Los ensayos se realizan generalmente a 30 o 37° según se indique. En las condiciones habituales de ensayo la concentración de enzima puede variarse entre 0,025 y 0,275 mg/ml sin afectar la dependencia lineal de la concentración de enzima y del tiempo de ensayo. En estas condiciones se permite un consumo hasta de un 20% del sustrato radiactivo. La unidad de actividad enzimática está definida según Berg y col. (13) y significa la incorporación de 1 nmol de UMP-³H en el RNA por incubación a 37° durante 60 minutos.

2. Medio de incubación para la enzima I de levaduras

Contiene, en un volumen final de 0,06 ml, los siguientes componentes: barbital-HCl 12,5 mM; MnCl₂ 1,6 mM; NaF 6 mM; ATP, GTP, CTP 0,6 mM, UTP 0,1 mM, UTP-³H 0,48 μCi; DNA de timo de ternera 9,6 μg, 2-mercaptoetanol 2,5 mM, glicerol 15%, sulfato de amonio 16 mM, DTT 1 mM, MgCl₂ 2,5 mM, EDTA 0,25 mM, el pH final de la mezcla es 7,9. El ensayo se realiza a 30° y durante 5 minutos a una concentración final de enzima de 0,16 mg/ml

(la formación de producto demostró ser lineal en estas condiciones).

3. Medios de incubación para las enzimas I y II de hígado de rata

La mezcla contiene en 0,06 ml: barbital-HCl 20 mM (pH 7,9), $MnCl_2$ 1,6 mM, NaF 6 mM, ATP, GTP, CTP 0,6 mM, UTP- 3H 0,4 μCi , DNA de timo de ternera 15 μg , 2-mercaptoetanol 5 mM, glicerol 12,5%, DTT 0,05 mM. La enzima I fue ensayada en presencia de sulfato de amonio 0,04 M y la enzima II en 0,12 M sulfato de amonio. La mezcla se incubó durante 5 o 10 minutos a 37°C a una concentración de proteínas entre 0,31 y 0,53 mg/ml. Se utilizó barbital-HCl como tampón, ya que no presenta grupos amino primarios que pudieran formar una base de Schiff con PLP. Este compuesto no tiene ningún efecto inhibitorio sobre la actividad enzimática. En todas las mezclas de incubación se comprobó que el pH final fuera el indicado.

B. ENSAYO DE UNION DE RNA POLIMERASAS A DNA

Se usó el método de Jones y Berg (69) modificado según Hinkle y Chamberlin (70). Este procedimiento se basa en la propiedad de las enzimas de ser retenidas cuantitativamente en filtros de nitrocelulosa. En cambio el DNA, en las mismas condiciones, no es retenido. Al usar DNA radiactivo, la retención del isótopo en el filtro es una medida directa de la formación del complejo enzima-DNA. Con este objeto se incubó la enzima a 37°C

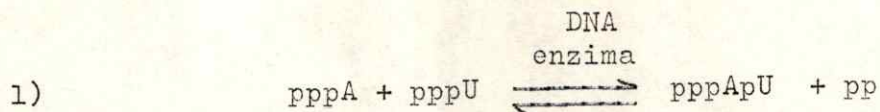
durante 10 minutos en un volumen final de 0,1 ml con 0,3 μg de DNA- ^3H de células HTC, o alternativamente con 2 nmoles de poli d(AT)- ^3H en una mezcla que contiene 50 μg de BSA, barbital-HCl 20 mM, pH 8,0, MgCl_2 10 mM, NaCl 100 mM, 2-mercaptoetanol 10 mM y EDTA 1 mM (solución de unión). Esta mezcla se preincuba previamente 2-3 minutos a 37° y luego se inicia el ensayo agregando la enzima cuya concentración se varía entre 10 y 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para la enzima de E. coli y 10 y 120 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para la enzima de levaduras. La incubación es finalizada agregando 1 ml de solución de unión que carece de BSA, la mezcla es rápidamente removida con pipeta pasteur y filtrada en discos de nitrocelulosa de 24 mm de diámetro (millipore tipo HAW24). Los discos han sido previamente sumergidos en solución de unión sin BSA al menos por 2 horas. La filtración se realiza en un aparato con el sistema Millipore acondicionado para el filtrado simultáneo de 12 discos. Luego de lavar 2 veces con 1 ml de solución de unión sin BSA, los filtros se remueven y se secan bajo luz infrarroja. Se determina su radiactividad en contador de centelleo líquido. Entre un 2-4% del DNA- ^3H queda retenido en el filtro, en ausencia de enzima, en las condiciones descritas.

C. ENSAYO DE INICIACION DE LA SINTESIS DE RNA

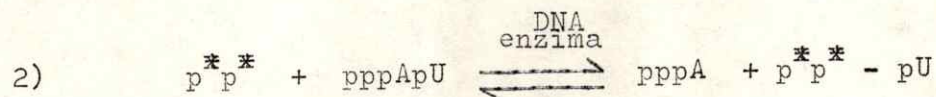
El ensayo de iniciación se basa esencialmente en el método de Krakow y Fronk (71) que permite medir la reacción de intercambio de ^{32}P -PP_i dirigida por poli d(AT) en presencia de

ATP y UTP.

La reacción de iniciación después de la unión a DNA hasta la formación del primer enlace fosfodiéster puede resumirse en el esquema siguiente:



Esta reacción es reversible y en presencia de $[^{32}\text{P}]\text{-PP}_i$ puede lograrse la incorporación de éste (abreviado p^{**} en la ecuación) en un nucleótido, como se indica en la reacción siguiente:



La enzima de E. coli nativa o modificada con PLP (ver modificación de la enzima por PLP) se agrega en una concentración final de proteínas de 0,1 mg/ml a una mezcla de incubación que en un volumen final de 0,1 ml contiene: Tris-HCl 50 mM (pH 8,0); 2-mercaptoetanol 10 mM; MgCl_2 4 mM; poli d(AT) 8 μg ; ATP 4×10^{-6} M; UTP 4×10^{-4} M y $[^{32}\text{P}]\text{-PP}_i$ 0,32 μCi . La mezcla se incuba a 37°C durante 30 minutos. La reacción se detiene agregando 0,2 ml de EDTA 0,2 M (pH 6,0) y 0,1 ml de una solución saturada de $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ a 25°C y ajustada a pH 6,0 con KH_2PO_4 sólido. La separación del $[^{32}\text{P}]\text{-PP}_i$ se logra por adsorción de los nucleótidos en carbón activado. Antes de usar, 10 g de carbón en polvo se tratan con

500 ml de HCl 0,1 N y luego de 30 minutos se filtra por Buchner y se lava exhaustivamente con 3 litros de agua destilada hasta que la conductividad del filtrado haya descendido a 10 μ mho. Una vez detenido el ensayo de iniciación, se agrega 0,2 ml de una suspensión que contiene 2,5% de carbón activado y 0,25% de dextransulfato de sodio disuelto en $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 10 mM ajustado a pH 6,0 con KH_2PO_4 . Luego se agregan 3 ml de $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 10 mM ajustado a pH 6,0 con KH_2PO_4 y se filtra por discos de fibra de vidrio (Whatman GF/C) de 25 mm de diámetro, previamente remojados durante 2 horas en $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 10 mM (pH 6,0). Se filtra en forma suave con bomba de vacío y los filtros se lavan con 9 ml (3x3 ml) de $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 10 mM ajustado a pH 6,0. Luego de secarlos bajo lámpara infrarroja se determina su radiactividad en líquido de centelleo TENAP (ver medición de radiactividad). El dextransulfato de sodio tiene por objeto permitir la adhesión del carbón al filtro mediante la formación de una película de carbón compacta, que no flota en el líquido de centelleo (72). Los valores de radiactividad de ^{32}P -PP_i fueron debidamente normalizados según la curva de desintegración del isótopo.

D. ENSAYO DE LA UNION DE PLP A RNA POLIMERASA

1. Método espectrofotométrico

El ensayo de unión de PLP a RNA polimerasa de E. coli mediante análisis espectrofotométrico permite calcular el número de moles de PLP unidos covalentemente a la enzima. Esto se realiza

midiendo los valores de absorbancia a 325 y 280 nm que corresponden a los máximos de absorción de N- ϵ -fosfopiridoxil-lisina y RNA polimerasa a partir de espectros de la enzima tratada con diferentes concentraciones de PLP. El procedimiento para una determinada muestra es el siguiente: A partir de la enzima más purificada (20 mg/ml) , se prepara una dilución común para varias muestras, en una mezcla que contiene barbital-HCl 20 mM (pH 8,0), glicerol 10%, MgCl₂ 2 mM, EDTA 0,2 mM, DTT 1 mM y alcohol isopropílico 0,026% (v/v). La concentración final de proteínas es de 0,3 mg/ml. A 0,98 ml de esta dilución se agregan alícuotas apropiadas de PLP disuelto en BGMED para dar concentraciones finales entre $0,5 \times 10^{-5}$ M y 50×10^{-5} M en un volumen final de 1,0 ml. Luego de incubar los tubos durante 30 minutos a 30° se reduce la base de Schiff formada con 5 μ l de una solución recién preparada de NaBH₄ 0,2 M y se coloca de inmediato en hielo. Diez minutos después se sacan alícuotas de 20 μ l de cada tubo para ensayo de actividad en duplicado, según se describe anteriormente. El remanente de cada tubo se somete a diálisis contra 1 litro de tampón fosfato 0,1 M pH 7,5 que tiene además EDTA 0,1 mM, MgCl₂ 2 mM, 2-mercaptoetanol 2 mM y glicerol 5%. La diálisis se realiza por 20 horas con 5 cambios.

Los espectros se determinaron en un espectrofotómetro de doble haz Cary modelo 118-C utilizando cubetas de 1 cm de paso de luz. En la cubeta de referencia se coloca sólo tampón de diálisis y se ajusta previamente la línea base en el rango de 270 -

500 nm usando el sistema de autocompensación de ranura, según lo permite el aparato. Un fondo escala de 0,1 unidades de absor**u** bancia resultó satisfactorio en la mayoría de los casos. El aná**l** lisis espectral permite definir los máximos de absorción a 325 nm que fueron utilizados posteriormente para el cálculo de los mo**l** les de fosfopiridoxil-lisina presentes en la enzima consideran**do** do un coeficiente de extinción molar para N- ϵ -fosfopiridoxil-lisina igual a 10.150. La concentración de enzima se determinó después de la diálisis a 280 nm en base al coeficiente de extinción $E_{280}^{1\%} = 6,5$ definido por Richardson (73). El análisis espectral asegura que la reducción con NaBH_4 ha sido completa.

2. Método radiactivo

- a) Reducción con $\text{NaB-}^3\text{H}_4$. La incorporación de PLP se midió siguiendo un procedimiento basado en la retención cuantitativa de la RNA polimerasa en filtros de nitrocelulosa (69,74). La RNA polimerasa I de levaduras (0,8 mg/ml) se incubó en un volumen de 0,1 ml, con concentraciones de PLP entre 0,02 y 0,4 mM, durante 20 minutos, a 30°, en tampón barbital-HCl 20 mM, pH 7,9, glicerol 10%, MgCl_2 5 mM, EDTA 0,5 mM y DTT 0,5 mM. Luego se agregó $\text{NaB-}^3\text{H}_4$ 1 mM (185 Ci/mol) y se incubó 5 minutos más a 0°. Para determinar el número de moles de PLP por mol de enzima I de levaduras que la **inactivan** completamente, se procesaron

idénticamente otras muestras, pero se redujeron con NaBH_4 no radiactivo y se ensayaron para determinar la actividad enzimática. Las muestras radiactivas posteriormente se trataron con un exceso de NaBH_4 (0,1 M final), se filtraron en discos de nitrocelulosa (millipore HAWP, 0,45 μ) y se lavaron exhaustivamente con NaBH_4 1 mM. Los filtros se secaron y se contaron en líquido de centelleo "filter solv" (Beckman). La incorporación de 1 mol de PLP por mol de enzima retuvo 8.500 cpm en el filtro. La marcación de las subunidades de la RNA polimerasa de E. coli y de la enzima I de levaduras se realizó también reduciendo con $\text{NaB-}^3\text{H}_4$, pero las enzimas se precipitaron con TCA, las subunidades marcadas se separaron por electroforesis en geles de poli-acrilamida-SDS y la radiactividad se visualizó por fluorografía.

- b) Incorporación de $\text{PLP-}^3\text{H}$ preparado químicamente. Se midió en base a la retención cuantitativa de la enzima en filtros de nitrocelulosa (69,74). Para la determinación del número de moles de $\text{PLP-}^3\text{H}$ unidos por mol de enzima y que la inactivan completamente, se incubó la RNA polimerasa de E. coli (0,2 mg/ml) en un volumen de 0,1 ml, con $\text{PLP-}^3\text{H}$ (26 Ci/mol) entre 0,0091 y 1,6 mM a 37°, durante 20 minutos, en BGMED (barbital-HCl 20 mM, pH 8,0, glicerol 5%, MgCl_2 10 mM, EDTA 0,1 mM y DTT 0,1 mM) o bien, en solución de unión BBB (barbital-HCl 20 mM, pH 8,0, MgCl_2 10 mM, EDTA 1 mM,

2-mercaptoetanol 10 mM y NaCl 100 mM). Se redujo con NaBH_4 2 mM a 0° , se diluyó a 1 ml con la misma solución usada en la incubación, y se filtró en discos de nitrocelulosa. Los filtros se lavaron con 5 ml del mismo tampón, se secaron y se determinó la radiactividad en el líquido de centelleo usual. Aproximadamente un 6% de $\text{PLP-}^3\text{H}$ quedó retenido en el filtro, en ausencia de enzima en las condiciones descritas. Los experimentos de protección por nucleótidos, DNA y antibióticos se realizaron en forma similar, incubando la RNA polimerasa de E. coli (aproximadamente 0,6 mg/ml) en tampón BGMED, con $\text{PLP-}^3\text{H}$ 0,1 mM y luego se redujo con NaBH_4 2 mM. Para analizar el efecto protector se preincubó previamente el compuesto con la enzima un tiempo adecuado, antes de ensayar la unión de $\text{PLP-}^3\text{H}$. Las demás condiciones fueron las mismas descritas anteriormente.

E. PURIFICACION DE LAS ENZIMAS

1. RNA polimerasa de E. coli

Para purificar esta enzima se han utilizado los métodos de Berg y col. (13) y Burgess y Jendrisak (15) con algunas modificaciones. En ambos casos se obtiene una enzima más de 90% pura, como se deduce del análisis electroforético en geles de poliacrilamida. El método de Burgess y Jendrisak presenta ciertas ventajas

como son su simplicidad, rapidez y fácil purificación de la enzima en gran escala.

1.1. Método de Berg y col.

- a) Preparación del extracto: 100 g de célula de E. coli cepa K-12 congeladas se mezclan con 300 g de arena de vidrio y 90 ml de tampón A (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, MgCl₂ 10 mM, DTT 0,1 mM, EDTA 0,1 mM y glicerol 5% v/v) y se rompen en una licuadora Waring Blendor manteniendo la temperatura entre 4-10° por inmersiones sucesivas en un baño de metanol a -80°. Durante la homogenización, si es necesario, se agrega más arena de vidrio para mantener la consistencia de la mezcla. Luego de homogenizar durante 12 minutos en lapsos de 2 minutos cada vez utilizando la posición intermedia de la licuadora, y enfriando el extracto según se requiera, se agregan 120 ml de tampón A y se homogeniza un minuto a baja velocidad. Se deja sedimentar la arena de vidrio durante 20 minutos, se separa el sobrenadante y la arena de vidrio se lava con 105 ml de tampón A. Se homogeniza nuevamente en la licuadora por 1 minuto a velocidad reducida y se deja decantar nuevamente. Los sobrenadantes obtenidos se juntan y se centrifugan en rotor GSA a 27.000 x g durante 90 minutos (fracción I, 185 ml).
- b) Remoción de ácidos nucleicos. Esta etapa del procedimiento de Berg y col. utiliza desoxiribonucleasa para remover

el DNA presente en el extracto, pero se ha reemplazado por la modificación descrita por Mangel (75) que consiste en agregar DEAE-celulosa equilibrada con KCl 0,3 M al extracto con lo que se remueve un 25% de los ácidos nucleicos. A la fracción I de la etapa anterior se agrega KCl sólido hasta una concentración 0,3 M. Luego se agrega 40 g de DEAE-celulosa parcialmente seca (82% de humedad) previamente equilibrada con KCl 0,3 M en tampón A y se agita por 20 minutos a 0°. La mezcla se coloca en una columna de vidrio con lana de vidrio en el fondo, para retener la DEAE-celulosa y permitir la elución del extracto. La columna se lava con 50 ml de tampón A con KCl 0,3 M. El eluido y el lavado se juntan y se precipita con sulfato de amonio (36 g/100 ml extracto) ajustando el pH a 8,0 con NaOH. Se deja precipitando durante la noche. Se centrifuga a 20.000 rpm por 40 minutos y el precipitado se homogeniza con 100 ml de sulfato de amonio al 55%. Se agita por 20 minutos a 4°. Se repite la centrifugación anterior y el precipitado obtenido se homogeniza con 100 ml de sulfato de amonio 1,2 M. Se agita como antes. Se centrifuga nuevamente y el sobrenadante se lleva a 2,5 M agregando sulfato de amonio sólido. Se deja en reposo durante la noche. El precipitado se disuelve en aproximadamente 400 ml de tampón A (fracción II).

- c) Fraccionamiento con sulfato de protamina: Se ajusta la conductividad de la fracción II a 2 ppm de sulfato de amonio (diluída 1:5.000). Esto se logra generalmente agregando 80 ml de H₂O bidestilada a 400 ml de la fracción II. Se precipita esta fracción agregando 19,5 ml de sulfato de protamina al 1% en H₂O bidestilada. Luego de colectar el precipitado por centrifugación se lava con 60 ml de acetato de magnesio 0,1 M en tampón A y se centrifuga como antes. El precipitado se extrae con 80 ml sulfato de amonio 0,1 M y se agita por 60 minutos a 40. La centrifugación se realiza como ya se ha descrito. El sobrenadante (76 ml) corresponde a la fracción III.
- d) Fraccionamiento con sulfato de amonio: La fracción III se precipita agregando sulfato de amonio hasta 55% de saturación manteniendo el pH en 8,0. Luego de 15 minutos el precipitado se separa por centrifugación y se le somete a extracciones sucesivas con sulfato de amonio en tampón A 2,0 M (38 ml); 1,8 M (38 ml) y 1,6 M (25 ml). Luego de cada extracción se deja agitando por 15 minutos a 40 y se separan los sobrenadantes por centrifugación a 20.000 rpm por 20 minutos en rotor SS-34 (Sorvall). Se juntan los sobrenadantes y se precipita con sulfato de amonio sólido 2,5 M final, pH 8,0. El precipitado se centrifuga en rotor HB-4 (Sorvall) a 11.500 rpm durante 90 minutos, y se disuelve en 30 ml de tampón A (fracción IV).

- e) Cromatografía en DEAE-celulosa. Se utiliza una columna de 2,2 x 14 cm equilibrada con tampón B. Se coloca la fracción IV (30 mg) y se lava con un volumen de columna. Se eluye con 300 ml de una gradiente lineal de KCl 0,1 M en tampón B con un flujo de 1 ml/min. Se colectan fracciones de 6 ml y aquellas con la mayor actividad específica se precipitan con sulfato de amonio agregando 0,004 ml de NaOH 1 N por ml de solución. El precipitado se colecta por centrifugación y se disuelve en tampón de almacenaje (tampón A con 50% de glicerol) a una concentración de proteínas de 5 mg/ml (fracción V).
- f) Cromatografía en Bio-gel P-300. Esta etapa se realiza sólo si se desea una preparación muy purificada. 10-80 mg de enzima (fracción V) se precipitan con 1,5 volúmenes de sulfato de amonio saturado (pH 8,0) y se centrifuga en rotor HB-4 (Sorvall) a 11.500 rpm. El precipitado se disuelve en tampón A para dar una concentración de proteínas de 20 mg/ml. La muestra se coloca en una columna de Bio-gel P-300 de 2,5 x 100 cm equilibrada y eluida con tampón A. La cromatografía se hace con flujo inverso para evitar el empacamiento del gel. Se colectan fracciones de 5 ml a un flujo de 10 ml/hora. Las fracciones activas se precipitan y se guardan como se describe en la etapa anterior. La enzima obtenida en esta etapa es más de 90% pura y posee una actividad específica de 6.200 U/mg usando DNA de fago T₄ como molde.

En algunos casos, esta etapa ha sido reemplazada por una cromatografía en DNA-celulosa (76).

1.2. Método de Burgess y Jendrisak.

- a) Ruptura de las células. Esta etapa que originalmente utiliza lisozima y desoxicolato para romper las células, ha sido reemplazada por la del método de Berg y col. (13) usando reactivos y tampones como lo indican Burgess y Jendrisak (15). 300 g de células de E. coli cepa K-12 congeladas se rompen en fragmentos pequeños y se agregan 400 ml de tampón TGED (tris-HCl 10 mM pH 8,0, glicerol 5% (v/v), EDTA 0,1 mM y 2-mercaptoetanol 20 mM) que contiene NaCl 0,2 M y fenilmetilsulfonilfluoruro 23 µg/ml junto con 840 g de arena de vidrio previamente equilibrada en el mismo tampón. Se homogeniza en Waring Blendor en la posición mínima 3 veces por 3 minutos. Luego se agregan 180 g más de arena de vidrio para mantener la consistencia del extracto y se homogeniza nuevamente 2 veces por 3 minutos en la posición máxima. Luego se agregan 250 ml de TGED + NaCl 0,2 M y se homogeniza 1 minuto en la posición mínima. Se separa el sobrenadante por decantación durante 30 minutos y la arena de vidrio se lava nuevamente con 250 ml de TGED + NaCl 0,2 M. Se homogeniza 1 minuto en la posición mínima y se decanta nuevamente en igual forma. El sobrenadante obtenido se junta con el anterior y se homogeniza durante 30 segundos a alta velocidad. Se agrega

500 ml de TGED + NaCl 0,2 M y se repite la homogenización. Este homogenizado (aproximadamente 2.000 ml) se centrifuga en rotor GSA (Sorvall) a 8.000 rpm por 60 minutos. Se obtiene un sobrenadante ámbar (1.340 ml).

b) Fraccionamiento con Polimina P. Se prepara una solución de polimina P 5% (v/v) en H₂O bidestilada y se lleva a pH 7,3 con HCl 6 N obteniéndose una solución opalescente. Se agregan 47 ml de esta solución al sobrenadante de la etapa anterior (1.340 ml) para dar una concentración final de Polimina P de 0,35% (v/v) y se agita lentamente por 5 minutos obteniéndose un precipitado blanco. Se centrifuga en rotor GSA a 7000 rpm por 15 minutos y el precipitado se resuspende con homogenización en 1.200 ml de TGED + NaCl 0,5 M. Se agita durante 5 minutos y se centrifuga en la misma forma anterior. El precipitado se resuspende nuevamente por homogenización con 1.200 ml de TGED + NaCl 1,0 M y se agita por 5 minutos. Se centrifuga por 30 minutos a 7000 rpm y el sobrenadante (1120 ml) se precipita con sulfato de amonio sólido (35 g por 100 ml de sobrenadante) ajustando el pH a 8,0. Se deja precipitando durante la noche a 4°C.

c) Cromatografía en DNA-celulosa: Se usa columna de DNA-celulosa de 2,5 x 40 cm que contiene 0,77 mg de DNA de timo de ternera por ml de celulosa preparada como se indica en Materiales y Métodos. El precipitado obtenido del fraccionamiento con Polimina P se centrifuga en rotor GSA (Sorvall)

a 9000 rpm por 45 minutos y se disuelve en TGED (480 ml) hasta obtener una conductividad equivalente a TGED + NaCl 0,15 M. La columna previamente equilibrada con TGED + NaCl 0,15 se carga con 480 ml de la solución de enzima y se lava con 400 ml del mismo tampón. Luego se aplica un gradiente lineal de NaCl 0,15-1,0 M (250 + 250 ml). Las fracciones con mayor actividad enzimática se colectan (240 ml) y precipitan con sulfato de amonio (35 g/100 ml de solución) ajustando el pH a 8,0. Se deja precipitando durante la noche a 4°C y se centrifuga en rotor HB-4 (Sorvall) a 10.000 rpm por 70 minutos. El precipitado se disuelve en 6,0 ml de TGED + NaCl 0,5 M dando aproximadamente 40 mg/ml de proteínas.

- d) Filtración en gel a fuerza iónica alta. Mediante esta etapa es posible eliminar impurezas que difieren en peso molecular con la enzima. Para esto se recurre a filtración en geles de agarosa en alta fuerza iónica para obtener la enzima en su estado monomérico (PM 500.000). Para esto se ha usado una columna de Bio-gel A 1,5 m de 1,5 x 72 cm o alternativamente una columna de Sepharosa 6B (2,5 x 75 cm) obteniéndose en ambos casos los mismos resultados. Las columnas se cargan con aproximadamente 3,0 ml de la solución de enzimas y se eluye con TGED + NaCl 0,5 M. Se colectan fracciones de 2 ml a un flujo de 0,4 ml/min. Se ensaya actividad y proteínas a 280 nm en las fracciones. Se juntan

aquellas con mayor actividad enzimática y se precipitan con sulfato de amonio sólido como se ha descrito antes. El precipitado obtenido se centrifuga en rotor HB-4 (Sorvall) a 9000 rpm durante 70 minutos y se disuelve en aproximadamente 4-5 ml de tampón de almacenaje (barbital 20 mM pH 8,0, $MgCl_2$ 10 mM, EDTA 0,1 mM y glicerol 50%) dando una concentración de proteínas entre 10 y 20 mg/ml.

2. RNA polimerasa de hígado de rata

Las polimerasas I y II se purificaron parcialmente a partir de núcleos por un método que combina los procedimientos de Roeder y Rutter (27). Kedinger y col. (77), Gissinger y Chambon (40) y Kedinger y Chambon (41). La enzima I fue purificada por fraccionamiento con sulfato de amonio, cromatografía en DEAE-celulosa, cromatografía en DEAE-Sephadex y centrifugación en gradiente de glicerol. Para la enzima II se utilizaron las mismas técnicas, omitiéndose la cromatografía en DEAE-Sephadex. Las etapas de purificación se describen en detalle a continuación:

a) Solubilización de la enzima y remoción de la cromatina.

Los núcleos obtenidos de 1400 g de hígado de rata, preparados por el método de Widnell y Tata (78) se lisan en sulfato de amonio 0,3 M y se someten a sonicación por 5 minutos en un sonicador Bronwill Biosonic III. Después de diluir el sulfato de amonio a 0,1 M con TGMed (Tris-HCl 50 mM pH 7,9, glicerol 30%, $MgCl_2$ 5 mM, EDTA 0,5 mM y DTT

0,5 mM) se centrifuga a $44.000 \times g$ durante 30 minutos. Las proteínas del sobrenadante se precipitan con sulfato de amonio sólido a 50% de saturación y a pH 8,0. Luego de una nueva centrifugación igual a la anterior, el precipitado se disuelve en TGMED.

- b) Cromatografía en DEAE-celulosa. La solución de enzima se ajusta a una concentración final de sulfato de amonio de 0,05 M por análisis conductimétrico y se aplica en una columna de 350 ml (30 cm de largo x 4 cm de diámetro). Las enzimas I y II se separan por elución fraccionada como lo describe Mandel y Chambon (79) usando, secuencialmente TGMED que contiene sulfato de amonio 0,05, 0,12; 0,14; 0,16 y 0,30 M. Las fracciones que contienen enzima I eluidas con sulfato de amonio 0,12 M se juntan y precipitan con sulfato de amonio sólido a pH 8,0. Se centrifuga como antes y se disuelve en TGMED. El mismo procedimiento se sigue para las fracciones que contienen la enzima II las cuales son eluidas con sulfato de amonio 0,3 M.
- c) Cromatografía en DEAE-Sephadex. El método se basa en los principios de filtración iónica (80). La enzima I de la etapa anterior se ajusta a una concentración final de sulfato de amonio 0,3 M y se deposita en una columna de 40 cm x 3 cm de diámetro que contiene DEAE-Sephadex A-25 previamente equilibrado con sulfato de amonio 0,1 M en TGMED. La columna se eluye con TGMED-sulfato de amonio 0,3 M.

Los tubos con mayor actividad específica se juntan y precipitan con sulfato de amonio sólido a pH 8,0.

- d) Centrifugación en gradiente de densidad de glicerol. La enzima I proveniente de la cromatografía en DEAE-Sephadex o la enzima II de la cromatografía en DEAE-celulosa se someten a centrifugación en un gradiente lineal de glicerol entre 15 y 30% como lo describe Kedinger y Chambon (41). El tampón usado fue BGMed que contiene barbital HCl 20 mM (pH 7,9) en lugar de Tris-HCl 50 mM pH 7,9. Se juntan las fracciones activas, se ajusta la concentración de glicerol a 50% y se guarda a -80° hasta su uso. De este modo se obtienen la enzima I de hígado de rata con una actividad específica de 20 U/mg de proteína y la enzima II de la misma fuente con 38 U/mg de proteína.

3. RNA polimerasa I de levaduras

La enzima I proveniente de levadura fue purificada por el método descrito recientemente por Valenzuela y col. (37). Las etapas de purificación se describen en detalle en los párrafos siguientes.

- a) Preparación del extracto. Las células de levadura en fase logarítmica tardía, se colectan por centrifugación a baja velocidad, se lavan resuspendiéndolas en agua destilada fría y en 2 l. de tampón de extracción (Tris-HCl 0,02 M pH 8,0, glicerol 10% $MgCl_2$ 0,01 M, 2-mercaptoetanol 0,01 M,

EDTA 0,5 mM, sulfato de amonio 0,3 M, flururo de fenil metil sulfonilo 1 mM y 1% de DMSO, por 1000 g de células (peso húmedo). Las células lavadas se suspenden en una pequeña cantidad de tampón de extracción, y la pasta formada se agrega gota a gota sobre nitrógeno líquido.

Los precipitados obtenidos son almacenados a -80° . Las células preparadas de este modo pueden mantenerse por varios meses sin cambios apreciables en la actividad RNA polimerásica. El extracto de levadura se prepara por el método de Bhargava y Halvorson (81) con las modificaciones de Hager y Holland (82). Las células congeladas se rompen en una celda de Eaton (83) de 200 ml de capacidad en una prensa de French a una posición de 10.000 psi. Las células rotas se agitan con 2,2 l de tampón de extracción y el pH se ajusta a 8,0 con Tris sólido. Este homogenizado se centrifuga a $27.000 \times g$ durante 60 minutos (centrífuga Sorvall, rotor GSA). La parte clara del sobrenadante corresponde a aproximadamente 2,5 l de fracción 1. Esta fracción contiene en promedio 30 mg/ml de proteína.

- b) Tratamiento con fosfocelulosa. A 2,5 l de la fracción 1 se agregan 500 g (peso húmedo) de fosfocelulosa previamente equilibrada con tampón B (Tris HCl 20 mM, pH 8,0, 2-mercaptoetanol 10 mM, EDTA 0,5 mM y glicerol 10%) que contiene sulfato de amonio 0,15 M. Después de mezclar, la concentración de sulfato de amonio se reduce a 0,15 M agregando

un volumen más del mismo tampón. La suspensión se agita lentamente por 30 min y luego se filtra a través de papel filtro en Buchner sin permitir que la fosfocelulosa se seque. La pasta obtenida se suspende en 4 l del mismo tampón B que contiene sulfato de amonio 0,15 M. Se agita por 10 minutos y se colecta nuevamente por filtración. Este lavado se repite 3 veces. Después de la última filtración la pasta se suspende en 1 l de tampón B, que contiene sulfato de amonio 0,4 M. Se agita lentamente por 30 minutos y se filtra de igual manera que antes. El filtrado (1,3 l) contiene RNA polimerasa con una actividad específica de 32 U/mg de proteínas (fracción 2).

- c) Tratamiento con DEAE celulosa. 500 g (peso húmedo) de DEAE-celulosa previamente equilibrada en tampón C (Tris-HCl 20 mM pH 8,4; 2-mercaptoetanol 10 mM y EDTA 0,5 mM) que contiene sulfato de amonio 0,1 M se agregan a 1,3 l de fracción 2. Después de mezclar, la concentración de sulfato de amonio se baja a 0,1 M agregando 3 volúmenes de tampón C. La suspensión se agita suavemente por 30 minutos, se filtra como se ha descrito antes y se lava 4 veces con 2 l del mismo tampón anterior. La RNA polimerasa se eluye suspendiendo y agitando la pasta de celulosa por 30 minutos, en 800 ml de tampón C que contiene sulfato de amonio 0,3 M. Luego de la filtración se obtienen 900 ml de solución de enzima con una actividad específica de 100 U/mg de proteína (fracción 3).

- d) Cromatografía de filtración iónica por DEAE-Sephadex. La fracción 3 se precipita, con 35 g de sulfato de amonio por 100 ml de solución. Después de la disolución de la sal, se deja precipitar toda la noche a 4°C y se centrifuga a 50.000 x g por 30 minutos. El precipitado se disuelve en 12 ml del tampón B que contiene además 30% de glicerol y 0,35 M sulfato de amonio y se aplica a una columna de 30 x 4 cm de diámetro empacada con DEAE-Sephadex A-25. La columna ha sido previamente equilibrada con tampón Tris-HCl 20 mM pH 8,0 que contiene además glicerol al 25%, EDTA 0,5 mM. 2-mercaptoetanol 20 mM y sulfato de amonio 0,1 M. La columna se eluye con el mismo tampón que contiene sulfato de amonio 0,35 M. Se juntan las fracciones con actividad (53 ml). La enzima tiene una actividad específica de 195 U/mg de proteína (fracción 4).
- c) Centrifugación en gradiente de concentración lineal de sacarosa. La fracción 4 se precipita por diálisis contra tampón B saturado con sulfato de amonio. El precipitado se separa por centrifugación a 27.000 rpm durante 45 minutos (rotor Beckman SW-27) y se disuelve en tampón B con 20% de glicerol y KCl 0,2 M en un volumen final de 3,6 ml. Alícuotas de 0,6 a 1,0 ml se depositan en tubos de 13 ml con gradientes de sacarosa entre 5-20% (p/v) en Tris-HCl 0,05 M pH 8,0, glicerol 25%, EDTA 0,5 mM, KCl 0,2 M y 2-mercaptoetanol 0,02 M. Los gradientes se centrifugan a

40.000 rpm por 28 horas a 40 (rotor Beckman SW-40). Se colectan fracciones de 0,5 ml y se juntan aquellas con mayor actividad obteniéndose una enzima de actividad específica entre 250-300 U/mg. (Una unidad de enzima corresponde a la incorporación de 1 nmol de UMP en 10 minutos a 300), con una concentración de proteínas entre 0,75-1,5 mg/ml. La enzima se guarda a -800 (fracción 5).

F. EXPERIMENTOS CINETICOS

1. Inactivación por PLP y análogos

La reacción de inactivación de las RNA polimerasas por piridoxal 5'-fosfato y análogos se realizó incubando la enzima (E. coli 0,11 mg/ml, I de levaduras 0,25 mg/ml, I de hígado de rata 0,53 mg/ml y II de hígado de rata 0,31 mg/ml) en un volumen de 0,1 ml de un tampón que contenía barbital 20 mM, pH 7,9, glicerol 10% (se usó 30% con las enzimas de hígado de rata para mejorar su estabilidad), MgCl₂ 5 mM, EDTA 0,5 mM y ditioneitol (DTT) 0,5 mM. La reacción se inició agregando PLP o análogos preparados en el mismo tampón. A tiempo adecuado se sacaron alícuotas de 0,01 ml para la determinación de actividad. El valor de actividad inicial se corrigió por el efecto de dilución al agregar el PLP o análogo.

2. Efecto del pH, concentración de PLP y fuerza iónica en la reacción de inactivación

Estos parámetros sólo se estudiaron con la enzima de E. coli. En los estudios del efecto del pH, todos los tampones fueron de fuerza iónica 0,1 y se prepararon de acuerdo al Biochemists' Handbook (84). La enzima (0,18 mg/ml) ó $3,3 \times 10^{-7}$ M (considerando una pureza del 90% y un peso molecular de 480.000) se incubó a 30° en un medio de reacción que contenía 25 mM del tampón del pH requerido, glicerol 5%, $MgCl_2$ 1 mM, EDTA 0,1 mM y 2-mercaptoetanol 10 mM. La reacción se inició agregando PLP. Se tomaron alícuotas de 0,03 ml a tiempos adecuados para la determinación de actividad enzimática. Paralelamente se realizaron experimentos controles en los que se omitió PLP. Se demostró además que la dilución del PLP durante el ensayo de actividad no afectó significativamente los valores de las constantes de velocidad en las condiciones ensayadas. Como la enzima sufre una pequeña inactivación en el tiempo a diferentes pH, los resultados se refirieron como % de actividad de sus respectivos controles. En los estudios del efecto de la concentración de PLP, ésta se varió entre 1×10^{-4} y 5×10^{-4} M. El análisis de fuerza iónica se hizo utilizando diferentes concentraciones de $(NH_4)_2SO_4$ en la reacción de inactivación por PLP, a un pH de 8,6. Las alícuotas para la determinación de actividad se diluyeron de tal modo que todos los ensayos de actividad enzimática se realizaron a una misma fuerza iónica. Las constantes de

velocidad de pseudo primer orden se obtuvieron al multiplicar por 2,303 las pendientes de la diferencia de actividad a tiempo t y actividad residual supuesta a tiempo infinito ($A_t - A_{\infty}$). Los resultados fueron analizados por el método de los cuadrados menores en un computador digital pdp 8/E, Digital Computer Corp. Maynard, Mass. U.S.A.

3. Efectos de temperatura, aminos, NaBH_4 , sustratos y DNA en la reacción de inactivación por PLP

Los efectos de temperatura, aminos y NaBH_4 se analizaron cinéticamente en forma similar a la descrita recientemente en el párrafo 1. Se incubó la enzima de E. coli (0,11 mg/ml) a pH 8,0 con PLP 0,1 mM. Después de medir la reacción durante cierto tiempo, la incubación se dividió en dos, y una parte se trató con Tris-HCl 17,5 mM (compuesto con grupos aminos primarios) y la otra, con NaBH_4 (2,8 mM). Los valores de actividad se corrigieron para compensar el efecto de dilución de la enzima. Para las enzimas I y II de hígado de rata (ambas 0,38 mg/ml) se incubó a pH 7,9 con PLP 0,4 mM. El reactivo con aminos primarios (50 mM) se agregó en forma similar a la recién descrita. La reducción se hizo con NaBH_4 1,5 mM. Las otras condiciones son las mismas descritas en el párrafo 1 de esta sección.

El efecto de sustratos y DNA sobre la reacción de inactivación de la RNA polimerasa de E. coli se analizó incubando la enzima (0,18 mg/ml) simultáneamente con los nucleótidos o el DNA

(o ambos) en diferentes concentraciones, con PLP 0,1 mM a pH 8,0. Otras condiciones y detalles fueron los mismos descritos en el párrafo 2. Este mismo estudio se realizó con la enzima I de levaduras, incubando previamente la enzima (0,4 mg/ml) durante 5 minutos a 30° con los nucleótidos o DNA y luego se agregó PLP 0,2 mM iniciando la cinética a la misma temperatura y a pH 7,9. El resto de las condiciones y detalles son idénticos a los mencionados en el párrafo 1.

4. Análisis espectrofotométrico de formación de base de Schiff

Esta reacción se realizó en tampón barbital-HCl 20 mM, pH 8,0, glicerol 5%, MgCl₂ 1 mM, EDTA 0,1 mM y DTT 0,1 mM analizando el incremento de absorbancia a 430 nm en un espectrofotómetro Cary 118-C en cubetas de 1 ml. Las cubetas de muestra y referencia contenían PLP 0,1 mM. Se estudió la cinética de formación de base de Schiff para RNA polimerasa de E. coli (0,18 mg/ml), DNA de timo de ternera y de bacteriófago T₄ (0,15 mg/ml), Tris-HCl 0,2 mM, L-lisina 0,1 mM, ATP, GTP, CTP y adenina 1 mM. La reacción se inició agregando PLP a la cubeta de muestra.

G. PREPARACION DE DNA

1. DNA de bacteriófago T₄

El bacteriófago se obtiene por infección de células de E. coli B como se describe a continuación en a). El DNA de este

bacteriófago se prepara y purifica por el método de Thomas y Abelson (85) según se indica en b) y c).

a) Cultivo bacteriano e infección con fago. Se dispone de un cultivo en fase estacionaria de E. coli B obtenido por incubación durante toda la noche a 37° en un matrás de 50 ml con 20 ml de un medio que contiene 10 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de NaCl y gotas de silicona antiespumante. Se infectan 6 matraces de 2 l que contienen 250 ml cada uno del mismo medio anterior, con 2 ml del cultivo de E. coli en fase estacionaria y se crece en un agitador New Brunswick a 37° con agitación fuerte durante 90 minutos aproximadamente. En este lapso se verifica el crecimiento bacteriano por lectura de densidad óptica a 650 nm de alícuotas extraídas en forma estéril. Una vez alcanzado el valor de $D.O._{650} = 0,1$ ($1,2 \times 10^8$ células/ml) se procede a infectar con una solución de fago T₄ de título $3,18 \times 10^{11}$ unidades formadas de placas/ml (UPP/ml) a una multiplicidad de 0,1 (1 fago por 10 bacterias). Luego de la infección, se aumenta la agitación y se continúa la incubación 3 horas más, hasta que la $D.O._{650}$ haya descendido a 0,1 o se mantenga estable en un valor similar. Esto es un índice de lisis bacteriana. El cultivo se lleva a 4°, se agregan 10 ml de cloroformo, agitando suavemente para completar la lisis.

- b) Purificación del fago. El lisado se centrifuga a $5000 \times g$ (5500 rpm durante 15 minutos en rotor Sorvall GSA) para eliminar los restos celulares. El sobrenadante obtenido se centrifuga a $35.000 \times g$ (17.500 rpm durante 25 minutos en rotor Sorvall SS-34). El precipitado obtenido corresponde al fago T_4 . Este se suspende en $1/50$ del volumen original, en una solución que contiene amortiguador fosfato 50 mM pH $6,8$, $\text{NaCl } 0,4\%$, $\text{MgSO}_4 \text{ } 1 \text{ mM}$ y gelatina $0,001\%$. Se mantiene con agitación lenta a 4° durante la noche. Para una preparación más purificada se repite el ciclo de centrifugaciones y se resuspende el fago en la misma solución anterior. Esta solución de fagos puede titularse por la técnica corriente de conteo de placas de lisis, formadas luego de infección con diferentes diluciones de fago en placas de agar. Generalmente se obtiene un título alrededor de 2×10^{11} fagos/ml. Esta solución puede guardarse a 4° adicionando gotas de cloroformo para su preservación durante algunas semanas.
- c) Obtención del DNA del fago. Se basa en la extracción de las proteínas del fago con fenol, quedando el DNA en la fase acuosa. Se utiliza fenol redestilado y neutralizado con $1/50$ de su volumen, con tampón fosfato 1 M pH $6,8$. El fenol se satura por agitación en un embudo de decantación con un volumen igual de agua tamponada de la misma manera. La solución de fago ya purificada se ajusta a un valor de

absorbancia a 260 nm entre 5 y 15 y se agita con un volumen igual de fenol durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se enfría a 4°C y se deja en reposo para separar la fase fenólica de la acuosa. Si la separación de fases no se logra rápidamente, se puede centrifugar en tubos Corex a 5.000 rpm durante 20 minutos en rotor Sorvall SS-34. El procedimiento de extracción fenólica se repite 2 veces más en iguales condiciones removiendo cada vez la fase fenólica (inferior) con pipeta Pasteur. Finalmente la fase acuosa se centrifuga a 12.000 rpm por 10 minutos (rotor Sorvall SS-34) para remover algunas proteínas residuales. Se obtiene un sobrenadante claro que se dializa durante la noche a 4°C contra 2 l de tampón Tris-HCl 10 mM pH 8,0 y NaCl 4 g/l. Al día siguiente se realizan 3 cambios de la solución de diálisis (2 l cada 3 horas) y el último se deja durante la noche. En estas condiciones no se detecta fenol en la solución de diálisis, y se obtiene una solución de DNA de una concentración de 0,23 mg/ml estimada en base a la absorbancia específica de 0,0181 cm²/ug (85). Este DNA se concentra a 2,2 mg/ml tratando la bolsa de diálisis con aquacide II la que posteriormente se dializa exhaustivamente contra tampón barbital-HCl 20 mM, pH 8,0 y NaCl 50 mM. Este DNA se guarda congelado a -20°C en alícuotas de 1 ml. Sus características espectrales revelan una relación de D.O.₂₆₀/D.O.₂₈₀ de 2,1 lo que indica un alto grado de purificación.

2. DNA-³H de células de hepatoma de rata (DNA-³H de HTC)

Este DNA fue proporcionado por el Dr. P. Valenzuela y se obtuvo en base al método general de Zamenhof (86) que se describe a continuación. Se crecen células de tumor hepático de rata en un medio de cultivo estandar en condiciones apropiadas. A un litro de esta solución con $2,3 \times 10^5$ células/ml se agregan 5 mCi de [metil-³H]-timidina de actividad específica 20 Ci/mmol en solución acuosa estéril. Se deja en crecimiento por 72 horas y las células se separan por centrifugación a 9000 rpm por 30 minutos en rotor Sorvall GS-3. El precipitado se lava con 20 ml de EDTA 0,1 M pH 7,3 en frío, es homogenizado en Potter y luego se centrifuga a 120.000 rpm por 12 minutos en rotor SS-34. Este proceso se repite 2 veces más. El DNA se extrae del precipitado con 15 ml de NaCl 2 M frío por homogenización de 3 a 5 minutos en el mismo tubo de centrífuga y se deja en reposo a 4°C durante la noche. La mezcla se centrifuga a $1900 \times g$ a 0°C y se obtiene un sobrenadante opalescente del cual se precipita el DNA agregando lentamente 2 volúmenes de etanol absoluto con agitación lenta. Se obtiene un precipitado fibroso que se lava con etanol al 75%, se seca en evaporador rotatorio y se redisuelve en 20 ml de citrato de sodio 0,015 M pH 7,1 con NaCl 0,14 M. El DNA se desproteíniza por adición de 2,5 ml de SDS al 5% en etanol a 45% y la mezcla se deja agitando 1 hora a temperatura ambiente. Luego se agrega 1,25 g de NaCl sólido y se agita 30 minutos a temperatura ambiente. Se deja en reposo durante la noche a 4°C

para precipitar el SDS. Se centrifuga 1 hora a 31.000 x g y se obtienen 20 ml de un sobrenadante claro. El DNA se precipita nuevamente con etanol absoluto y se lava con etanol al 75% como ya se ha descrito, se seca y se disuelve en 3 ml de tampón citrato 0,015 M pH 7,1 con NaCl 0,14 M. Se deja con agitación suave a 40 durante la noche. Se obtiene una solución de DNA de aspecto viscoso, de 1,5 mg/ml y tiene una relación de D.O.₂₆₀/D.O.₂₈₀ de 1,85. La actividad específica de este DNA-³H es de 54.000 cpm/ug. Se guarda congelado en alícuotas pequeñas a -200.

H. PREPARACION DE DNA-CELULOSA

Se basa en el método de Alberts y Herrick (87). Ochenta g de celulosa Whatman CF-11 se lavan 3 veces con etanol caliente (700) filtrando cada vez al vacío para eliminar restos de piridina de las extracciones realizadas en su manufactura. Luego se lava en forma rápida por suspensiones y filtraciones sucesivas con 350 ml de NaOH 0,1 M, 350 ml de EDTA 1 mM y 1 litro de HCl 10 mM. Finalmente se lava con 2 litros de agua destilada hasta neutralizar la celulosa y se deja secar a 700 durante la noche. A partir de una solución de DNA de timo de ternera altamente polimerizado de 2 mg/ml disuelto en Tris-HCl 10 mM con EDTA 1 mM pH 7,4, se desnatura 100 mg de DNA en alícuotas de 5-10 ml por calentamiento a 1000 durante 10 minutos; se enfría rápidamente en un baño de hielo-metanol. Se agregan 9 g de celulosa purificada

a los 100 mg de DNA desnaturado, se mezcla bien y se coloca en un vidrio reloj. Se deja secar a temperatura ambiente por 3 días y luego todo un día a 50°. El polvo totalmente seco se suspende aproximadamente en 20 volúmenes de la solución de Tris-HCl 10 mM pH 7,4 con EDTA 1 mM y se deja 24 horas. a 4°. Se filtra al vacío y la DNA-celulosa obtenida se suspende en 40 ml de la misma solución Tris-HCl-EDTA y se guarda congelada a -20°. En estas condiciones se retiene en la celulosa un 68% del DNA agregado. Para determinar el DNA retenido se calienta una alícuota a 100° durante 20 minutos y el DNA liberado en el sobrenadante se determina espectrofotométricamente, o bien, en base a la técnica colorimétrica de Burton (88).

I. PREPARACION DE PLP-³H

Este método se basa fundamentalmente en la técnica descrita por Stock y colaboradores (89).

1. Reducción de PLP con NaB-³H₄

50 mg de PLP se suspenden en 0,6 ml de H₂O y se disuelven por adición de NaHCO₃ sólido. El pH de la solución se ajusta entre 7,5 y 8,0 con Na₂CO₃ sólido. Después de enfriar a 4° se agregan 5 mg de NaB-³H₄ de actividad específica 250 Ci/mol. La solución amarilla se descolora debido a la conversión del PLP a piridoxina 5'-fosfato-³H. Se deja en reposo aproximadamente 1 hora.

2. Oxidación de la piridoxina 5'-fosfato-³H con MnO₂

Luego de acidificar la piridoxina 5'-fosfato-³H con 0,4 ml de HClO₄ concentrado (11,6 M) en hielo hasta una concentración final de 4 M, se agregan 50 mg de MnO₂ "activado" preparado de acuerdo a Attenborrow y col. (90) y se deja con agitación lenta a -20° por 20 horas. El exceso de MnO₂ se descarta por centrifugación. El sobrenadante se neutraliza lentamente con KOH 4 M a 0° hasta aparición del color amarillo del PLP-³H (pH 8,5 aproximadamente). Todo el proceso realizado a continuación se efectúa evitando al máximo la exposición a la luz ambiente. El KClO₄ formado se separa por centrifugación y el precipitado se lava 2 veces con H₂O para recuperar el PLP-³H absorbido.

3. Purificación del PLP-³H

Los productos de oxidación y reactantes remanentes se separan por cromatografía de intercambio iónico en una columna de Dowex 1X8 (37 x 0,9 cm) en forma acetato. La mezcla que contiene PLP-³H (aproximadamente 5-8 ml) se coloca en la columna lavada exhaustivamente con H₂O. Se verifica previamente la conductividad de la carga, la que no debe ser mayor a 1 milimho. Si se requiere, la mezcla se diluye con H₂O. La columna se lava con 60 ml de H₂O y se eluye con (70 + 70) ml de una gradiente lineal de acetato de amonio entre 0,5 y 3,5 M, pH 5,6 a una velocidad de 0,5 ml/min. Se colectan fracciones de 1 ml a temperatura ambiente. Para cada fracción se lee D.O. a 325 y 390 nm, se mide

la conductividad y se determina la radiactividad en alícuotas de 5 μ l en mezcla de centelleo TENAP. En la figura 1 se muestra la parte correspondiente a la elución con gradiente salina de acetato de amonio. Se aprecia la separación de dos componentes radiactivos que por sus características espectrales se identifican como piridoxina 5'-fosfato y PLP. Estos resultados indican que la oxidación de piridoxina 5'-fosfato no es completa, pero es posible lograr, luego de desalinización, un rendimiento de un 30% en la obtención del producto.

4. Desalinización del PLP-³H

Se juntan las fracciones de PLP-³H de mayor actividad específica y se desaliniza por adsorción en una columna de Norita-celulosa (1,5 x 10 cm) en proporción 3:1 para facilitar el flujo. La celulosa es lavada previamente según lo describe Alberts y Herrick (87). La columna se lava con H₂O hasta bajar la conductividad a 15 μ mho y luego se eluye con NH₃ al 1%. Las fracciones que contienen PLP-³H se someten rápidamente a liofilización o alternativamente se evaporan a sequedad mediante un evaporador rotatorio para eliminar el NH₃. Se obtiene un producto higroscópico amarillo. La actividad específica del PLP-³H obtenido es de aproximadamente 26 Ci/mol. La concentración del PLP-³H se determina midiendo la D.O. a 390 nm en un espectrofotómetro Cary modelo 118-C usando un coeficiente de extinción molar de 4.900 M⁻¹ cm⁻¹ a pH 7,0 (91).

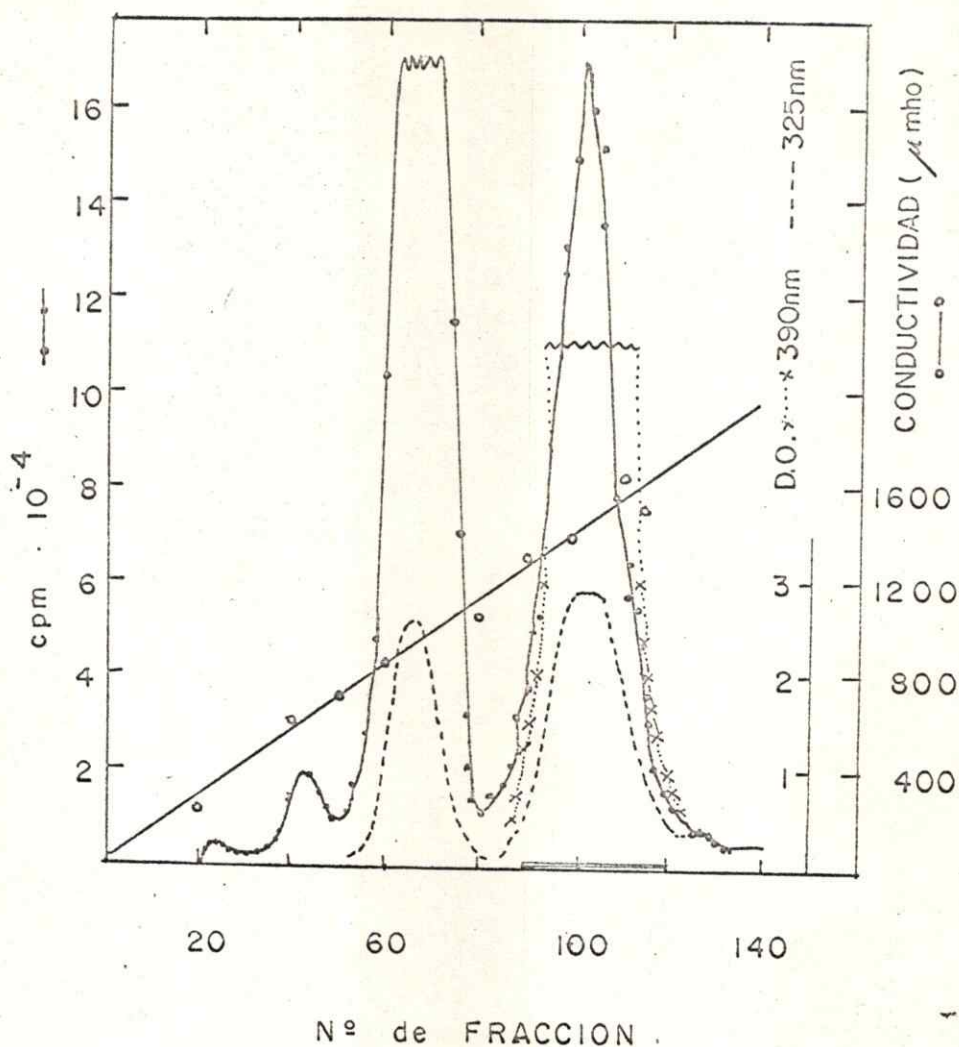


Figura 1. Purificación de PLP-³H. Cromatografía de intercambio iónico.

Se utilizó una columna de Dowex 1X8 (forma acetato) de 37 x 0,9 cm. Se eluyó con una gradiente lineal 70+70 ml de acetato de amonio entre 0,5 y 3,5 M, pH 5,6. Se colectaron fracciones de 1 ml con un flujo de 0,5 ml/min y se les determinó D.O. a 325 y 390 nm. Se midió la radiactividad en alícuotas de 5 μl , en mezcla centelleante TENAP como se indica en Métodos.

●—● radiactividad
X...X D.O. a 390 nm

○—○ conductividad (μmho)
----- D.O. a 325 nm

5. Identificación del PLP-³H

La identificación y pureza del PLP-³H sintetizado se realiza por cromatografía en capa fina de sílica de gel según método de H. Ahrens y W. Korytnk (92) en un sistema metil-etilcetona: etanol: amoníaco: agua, en proporción de volúmenes 3:1:1:1, a temperatura ambiente y en la obscuridad. Se revela:

- a) Con una solución de 2,6-dicloro quinona 4-cloroimida al 0,04% en isopropanol (reactivo de Gibbs). Se expone a vapores de amoníaco y la aparición de manchas azules o violetas indican reacción positiva (93).
- b) Por autoradiografía. Esta se realiza por el método de W. Bonner y R. Laskey (94). Se impregna el cromatograma con PPO al 7% en acetona y con él se impresiona un papel fotográfico durante 24 horas a -80°. Posteriormente se revela de acuerdo a los procedimientos fotográficos usuales. En la figura 2, se presentan los resultados de este revelado y se concluye que el producto purificado es idéntico al PLP comercial utilizado simultáneamente como patrón. La mancha más pequeña y de menor migración probablemente corresponde a un producto de fotooxidación de PLP, ya que no aparece como mancha radiactiva en la autoradiografía, implicando la pérdida del isótopo en la función aldehído. Esta explicación también ha sido sugerida por otros autores (95).

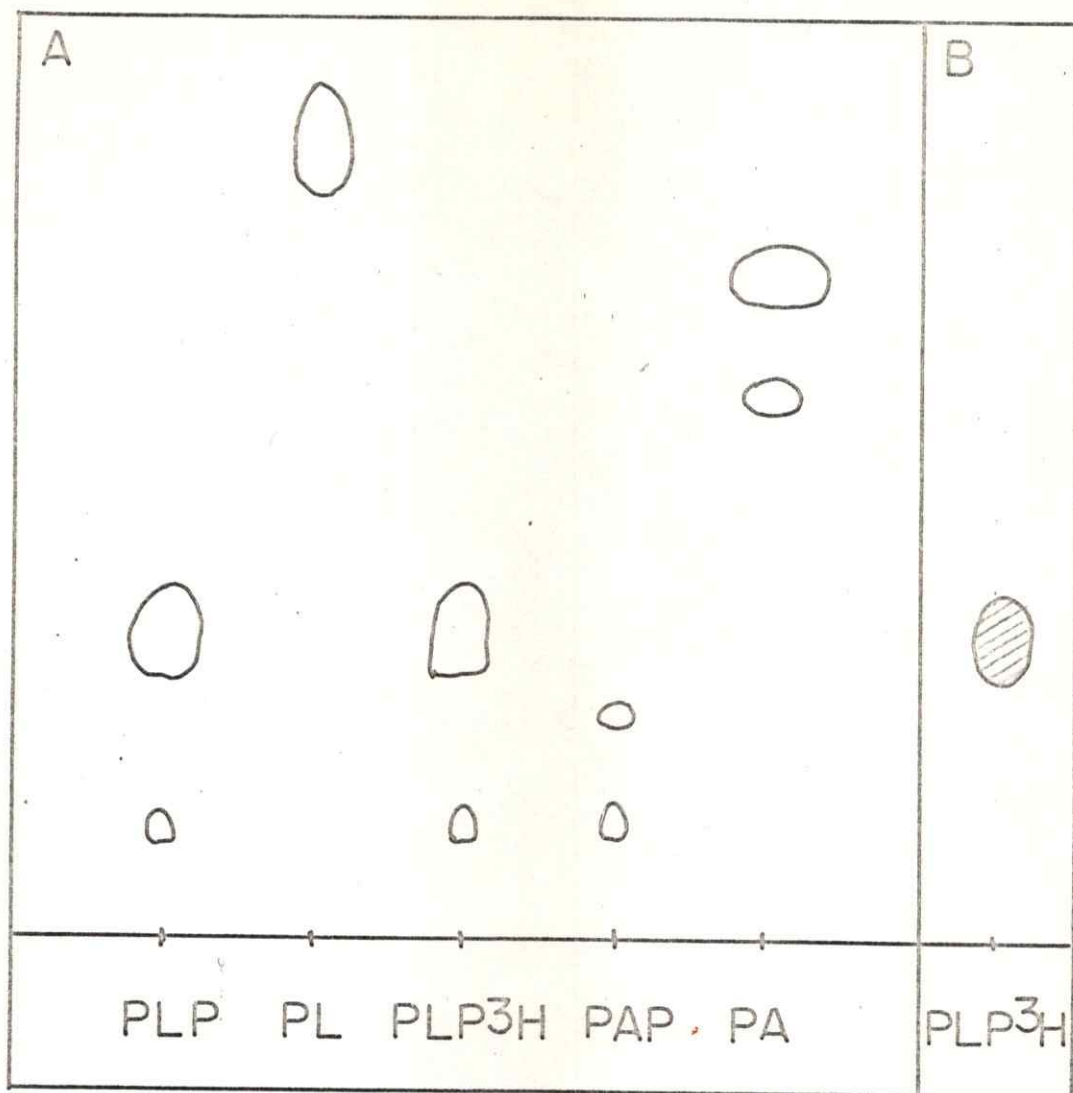


Figura 2. Identificación y pureza del PLP-³H.

Cromatografía en capa fina (sílica gel) del material radiactivo desalinizado y de soluciones patrones de piridoxal 5'-fosfato (PLP), piridoxal (PL), piridoxamina 5'-fosfato (PAP) y piridoxina (PA). Se aplicaron 2 μ l de soluciones 0,01 M de cada compuesto. El solvente de desarrollo fue metiletilcetona: etanol: amoníaco: H₂O en proporción 3:1:1:1 v/v.

A.- Se reveló con el reactivo de Gibbs.

B.- Se reveló la radiactividad por fluorografía.

J. PREPARACION DE N-^ε-PIRIDOXIL-LISINA

Se basa en el método de Schnackerz y Noltman (96). Se pesan 35 mg de bromuro de polilisina (P.M. aproximado de 41.000). Estimando el peso de la lisina en 146,1 se tiene 320 lisinas por mol de polilisina, es decir, la cantidad pesada de polilisina contiene 0,272 milimoles de lisina. Esta cantidad se disuelve en 1 ml de tampón barbital 20 mM pH 8,0 y se mezcla con 8 ml de una solución de piridoxal 5'-fosfato que contiene 0,8 milimoles, en tampón barbital 20 mM reajustado a pH 8,0 con NaOH 1 N. Esta mezcla se deja 15 minutos a temperatura ambiente y 20 minutos a 37°, evitando en lo posible toda exposición a la luz en esta etapa y posteriores. La mezcla de reacción se enfría en hielo y se agregan lentamente 8 milimoles de NaBH₄ sólido con agitación suave manteniendo el pH en 8,0 con HCl 6 N. Luego se deja la solución toda la noche a 4°. Se dializa exhaustivamente contra agua destilada y se evapora a sequedad en evaporador rotatorio. El producto se disuelve cuidadosamente en 1,5 ml de HCl 6 N, se transfiere a una ampolla que se sella al vacío y se hidroliza por incubación a 110° durante 26 horas. Posteriormente el hidrolizado se lleva a 20 ml con agua destilada y se evapora a sequedad en evaporador rotatorio varias veces lavando siempre con agua destilada para eliminar el HCl remanente. El producto obtenido revela una sola mancha fluorescente bajo luz ultravioleta por ensayo cromatográfico en papel y electroforesis de alto voltaje. Se guarda a 4° en solución acuosa y protegido

de la luz.

K. ELECTROFORESIS DE ALTO VOLTAJE

La electroforesis analítica de alto voltaje se realizó en un equipo Savant, en un estanque de lucita de 80 l de capacidad usando Varsol como refrigerante. Se eligió como solución de electroforesis la mezcla piridina: ácido acético: agua, en proporción de volúmenes 1:10:89 respectivamente, para obtener un pH de 3,55. Se colocaron aproximadamente 4 l de esta solución en cada compartimiento de los electrodos. El soporte utilizado en la electroforesis fue papel Whatman 3 MM de 68 x 46 cm. Las muestras se aplicaron separadamente en el centro del papel y espaciadas por 3 cm. Las muestras y colorantes de referencia y el estándar de N-ε-piridoxil-lisina se aplicaron en alícuotas de 2 ul, secando luego de cada aplicación con corriente de aire caliente; evitando que la mancha aplicada tenga un diámetro mayor a 0,5 cm. El papel se humedeció cuidadosamente con la solución de electroforesis y se montó en el soporte de lucita del aparato de electroforesis. Se sumergió completamente en el estanque verificando que los extremos del papel quedasen en contacto con la solución de electroforesis. Se aplicaron 40 volts/cm durante 100 minutos manteniendo la temperatura del Varsol en 20° con un baño refrigerante accesorio. Como colorantes de referencia se usaron verde de metilo al 0,5% y cristal violeta al 0,25%

ambos en solución alcohólica. Se colocaron 2×10^{-7} moles de PLP (20 μ l de una solución 0,01 M en H_2O) los que se detectaron por fluorescencia bajo luz ultravioleta y 10^{-7} moles de lisina que visualizaron por reacción con ninhidrina al 0,3% en alcohol. Las muestras aplicadas provenían de hidrolizados de la enzima de E. coli (2 mg) y de la enzima I de levaduras (2 mg). La cantidad de estándar de N- ϵ -piridoxil-lisina aplicada fue de 5×10^{-7} moles.

L. CROMATOGRAFIA EN PAPEL

La cromatografía en papel para la identificación de N- ϵ -piridoxil-lisina se realizó de acuerdo a Shapiro y col. (97) en un sistema descendente utilizando una cámara cromatográfica Precision Scientific. La cámara se saturó previamente durante 24 horas con la mezcla de solventes usada en el desarrollo cromatográfico y que consistía en n-butanol: piridina: ácido acético: agua, en proporción de volúmenes de 30:30:6:24 respectivamente. El papel utilizado fue Whatman 3 MM y las muestras se aplicaron en alícuotas en forma similar a la descrita para la electroforesis de alto voltaje, utilizando los mismos compuestos con la excepción de los colorantes de referencia que se omitieron. La cromatografía se corrió durante 18 horas a temperatura ambiente. Para el revelado del cromatograma se recurrió a visualización por fluorescencia bajo luz ultravioleta (lámpara germicida GE 15 T8) o nebulizando el cromatograma con una solución de ninhidrina al

0,3% en etanol. N- ϵ -piridoxil-lisina presente en los hidrolizados de las enzimas de E. coli y levaduras se detectó por radiactividad, contando una tira del cromatograma de 1 cm de ancho en trozos de 0,5 cm en el líquido de centelleo usual.

M. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

La electroforesis bajo condiciones desnaturantes se realizó en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 0,1%, en geles de poliacrilamida al 9 ó 12%, en tubos de vidrio de 10 cm de largo por 0,6 cm de diámetro interno, usando un equipo de electroforesis Buchler. Alternativamente, se usó el sistema de geles en placa de 12 x 15 cm de 1,5 mm de espesor en un dispositivo proporcionado por Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, Cal. U.S.A. Los tampones y soluciones se prepararon de acuerdo a Laemmli (98). Las muestras normalmente se diluyeron 1:1 con el amortiguador para la muestra, concentrado dos veces. Esta solución contenía Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8, SDS 6% (p/v), 2-mercaptoetanol al 10% (v/v) y glicerol al 20%. Las muestras se calentaron a 100° durante 3 minutos; luego se depositaron en el gel de concentración (acrilamida 3% (p/v), bisacrilamida 0,08% (p/v), tetrametilen etilendiamina (TEMED) 0,1% (v/v), persulfato de amonio 0,025%) y se aplicaron 75 volts para geles en placa, 90 volts para geles cilíndricos. Después que las muestras entraron al gel de resolución (acrilamida 9 u 11%,

bisacrilamida 0,27% y TEMED 0,05% y persulfato de amonio 0,025%) el voltaje se aumentó a 110 volts para geles en placa o 120 volts para geles cilíndricos. La fuente de poder estabilizada se usó en el sistema voltaje constante. Los geles se fijaron en una solución de TCA al 10% y alcohol isopropílico al 50% (v/v) con agitación durante 30 minutos a 23 Ω y se tiñieron con azul de Coomassie al 0,1% disuelto en TCA al 10% y alcohol isopropílico al 25%, durante 12 horas a temperatura ambiente. Los geles se destiñeron en TCA al 10% con agitación y a 23 Ω . Para los trazados densitométricos los geles cilíndricos se registraron directamente y los geles en placa se cortaron previamente en tiras de 1 x 10 cm. Ambos tipos de geles se analizaron en un accesorio para registro de geles de un espectrofotómetro Varian 635 a 600 ó 650 nm, a una velocidad de 25 mm/min. Para calcular la relación entre peso molecular y movilidad para este sistema se utilizaron varias proteínas de peso molecular conocido como: seroalbúmina de bovino fracción 5 (65.000), catalasa (57.500), ovalbúmina (40.000), anhidrasa carbónica (30.000), mioglobina de esperma de ballena (17.200) y citocromo c de corazón de caballo (12.500).

La electroforesis en condiciones no desnaturantes se realizó en forma similar a la antes descrita, omitiendo el SDS. Para los geles cilíndricos se utilizó un gel de concentración de acrilamida al 3,7% y bisacrilamida al 0,08% y un gel de resolución con acrilamida al 5% y bisacrilamida al 0,1%. En ambos se

usó persulfato de amonio al 0,025% y TEMED al 0,025%. Los geles en placa se polimerizaron con acrilamida al 3% y bisacrilamida al 0,08% en el gel de concentración, y en el gel de resolución 5 y 0,13% respectivamente. En ambos se usó persulfato de amonio y TEMED al 0,025%. Las condiciones de electroforesis durante el paso a través del gel de concentración fueron las mismas antes descritas pero en el gel de resolución se aplicó 150 volts en ambos sistemas de geles. La tinción se realizó en una solución de Azul de Coomassie al 0,2% en una solución que contenía etanol, ácido acético y agua en una relación de volúmenes de 5:1:5 respectivamente y se dejó durante 12 horas a temperatura ambiente. Para el desteñido los geles se agitaron a 37° en una solución similar a la anterior sin el colorante.

N. FLUOROGRAFIA

Este método ha sido descrito por Bonner y Laskey (94) y consiste en detectar compuestos marcados isotópicamente con ^3H , ^{14}C ó ^{35}S , utilizando un centellador (PPO) directamente embebido en el material que soporta las muestras (geles de poli(acrilamida, sílica gel), con el fin de detectar bajos niveles de radiactividad. Para esto se coloca una placa fotográfica sensible a la emisión del centellador (film de rayos X) en contacto directo con la muestra radiactiva, en oscuridad, y durante un tiempo adecuado a -70°. El procedimiento se describe en detalle a continuación.

1. Método aplicado a geles de poliacrilamida en placa

Después del proceso electroforético, el gel de poliacrilamida ya teñido se sumergió en 20 veces su volumen de dimetil sulfóxido (DMSO) y se dejó absorber este compuesto por 30 minutos. Se repitió este proceso con otra solución fresca de DMSO con el fin de desplazar completamente el agua del gel. Se traspasó el gel a una solución de 4 veces su volumen con PPO al 22,2% (p/v) en DMSO durante 3 horas. El gel se lavó con agua destilada y se secó en un dispositivo dotado de una placa plástica porosa, por medio de vacío y calor suave (lámpara infrarroja) para facilitar la deshidratación. El gel se puso en contacto con una placa del tipo RP Royal "X-O mat" ó film equivalente, de uso médico para rayos X. Se mantuvo a -70° durante 48 horas. El revelado de la placa se hizo de acuerdo a los procesos fotográficos usuales. El registro densitométrico de la placa se hizo en un accesorio para registro de geles de un espectrofotómetro Varian 635.

2. Método aplicado a placas de sílica-gel

El cromatograma de sílica-gel una vez revelado se recromatografió en forma ascendente, en una cámara hermética que contenía 100 ml de PPO al 7% (p/v) en acetona (99). En estas condiciones no se produjo desplazamiento de las manchas previamente reveladas y la impregnación en PPO fue satisfactoria. El cromatograma una vez seco se procesó como se describió anteriormente para

los geles de poliacrilamida.

Ñ. MEDICION DE RADIATIVIDAD

La radiactividad de las diversas muestras se determinó usando un espectrómetro de centelleo para líquido Nuclear Chicago modelo Mark II con una eficiencia de aproximadamente 58% para tritio. Se utilizaron tubos de conteo de 20 ml de capacidad conteniendo 10 ml de líquido de centelleo. Como soporte de las muestras se usó discos de 2,5 cm de diámetro de filtros de nitrocelulosa (Millipore), de fibra de vidrio Whatman GF/C o de DEAE celulosa (Whatman DE-81) según se indique. La solución centelleante corrientemente usada contenía 3 g/l de 2,5 difeniloxazol (PPO) y 0,1 g/l de 1,4-bis-2-(5-fenil oxazolil) benceno (POPOP) en tolueno. En algunos ensayos se utilizó líquido de centelleo TENAP que acepta 3,39% de H₂O con una eficiencia de 27,2% para tritio (100). Contenía 80 g de naftaleno, 4 g de PPO, 400 ml de etanol absoluto y tolueno en cantidad suficiente para un litro. En las muestras con ³²P se asignó un 100% de eficiencia a estos sistemas de conteo.

O. DETERMINACION DE PROTEINAS

La concentración de proteínas se determinó por los siguientes métodos:

- a) método de Lowry y col. (101) utilizado en extractos crudos y fracciones semipurificadas,
- b) método espectrofotométrico, por absorbanza a 280 nm, para análisis relativo de proteínas en las fracciones obtenidas de columnas cromatográficas y en las fracciones purificadas de la enzima de E. coli, en base al coeficiente de extinción $E_{280}^{1\%} = 6,5$ descrito por Richardson (73),
- c) micromodificación del método de Lowry aplicable a muestras con bajo contenido de proteínas y manejando volúmenes pequeños cuando el material a analizar es escaso. La modificación consiste en mezclar 0,05 ml de muestra con 0,02 ml de ácido poliadenílico (poli A) (5 mg/ml) y precipitar con ácido tricloroacético (TCA) al 10%. Luego de centrifugar a 3.000 x g, se separa el sobrenadante por succión, se secan las paredes del tubo y se disuelve el precipitado con 0,04 ml de NaOH 1 N. Luego se continúa igual que el método clásico de Lowry y col. (101) excepto que se completa a un volumen final de 0,25 ml. Se lee la absorbancia a 650 nm en un espectrofotómetro Beckman DU provisto de adaptador para microcubetas. El método permite detectar hasta 2 µg de proteínas por tubo.

II. MATERIALES

A. MATERIAL BIOLÓGICO

Las células de E. coli cepa K-12 se obtuvieron de Grain Processing Corp., Muscatine, U.S.A. Las células de levaduras fueron un producto de Red Star Yeast Co., Oakland, Calif. U.S.A. El bacteriófago T₄D y las células de E. coli cepa B fueron un obsequio del profesor Arturo Yudelevich.

B. PROTEINAS

Albúmina sérica de bovino, sulfato de protamina tipo I, bromuro de L-polilisina, ovoalbúmina, anhidrasa carbónica, mioglobina de esperma de ballena y citocromo c de corazón de caballo fueron productos de Sigma Chemicals, St. Louis, U.S.A. Catalasa se obtuvo de Mann Research Labs., New York, U.S.A.

C. REACTIVOS

1. Generales

Se obtuvieron de Sigma Chemicals Co., St. Louis, U.S.A.: piridoxal 5'-fosfato, piridoxamina 5'fosfato, piridoxina, piridoxal, dodecil sulfato de sodio, ditiotreitól, borohidruro de sodio, 2-mercaptoetanol, fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF),

DNA de timo de ternera, poli A, dimetil sulfóxido y nucleótidos. Ocasionalmente estos últimos fueron productos de P-L Biochemicals Inc. Milwaukee, Wisconsin, U.S.A. Naftaleno, 2,5-difeniloxazol (PPO), 1,4-bis-2-(5-feniloxazolil) benceno (POPOP), carbón activado y silicona antiespumante fueron productos de Merck, Darmstadt, Alemania. Se obtuvo acrilamida y N,N'-metilén-bisacrilamida de BioRad, California, U.S.A. Poli d(AT) fue un producto de Miles Labs. Inc., Elkhart, U.S.A. 2,6-dicloroquinona-4-cloroimida se obtuvo de Aldrich Chem. Co. Proc., Milwaukee, Wisconsin, U.S.A. Extracto de levadura, triptona y agar se obtuvieron de Difco Laboratories, Detroit, Michigan, U.S.A. Azul dextrano y dextrano sulfato de sodio fueron productos de Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia. N,N,N',N'-tetrametilen etilen diamina se obtuvo de Eastman Kodak Co., Rochester, U.S.A. Polimina P fue un producto de Basf, Ludwigshaven, Alemania. Rifampicina se obtuvo de Mann Research Labs, New York, U.S.A. Los filtros de fibra de vidrio GF/C y los discos de DEAE-celulosa DE-81 son productos Whatman Ltda., Springfield Mill, Maidstone, Kent, Inglaterra. Los filtros de nitrocelulosa HAWP 24 de 0,45 μ se obtuvieron de Millipore Corp., Bedford, U.S.A. El papel fotográfico se obtuvo de Kodak Brasileira Com. E. Ind. Ltda. El líquido de revelado y el de fijación son productos de Profesional. AF/013 fue donado por los profesores Riva, Fietta y Silvestri y es un producto de los laboratorios Lepetit, Milán, Italia, Sacarosa, glicerol y sulfato de amonio fueron reactivos de

grado enzimático. Los demás reactivos empleados fueron de grado analítico.

2. Isótopos

^3H -UTP (26 Ci/mol), $\text{Na}_4^{32}\text{P}_2\text{O}_7$ (2,95 Ci/mol) y NaB^3H_4 (250 Ci/mol) se obtuvieron de New England Nuclear, Boston, U.S.A. Polid(AT)- ^3H (25 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol P}$) fue un producto de Miles Labs., Inc., Elkart, U.S.A.

D. MATERIALES CROMATOGRÁFICOS

DEAE-celulosa DE-52, fosfocelulosa P-11, celulosa GF-11, fueron productos Whatman Ltda., Springfield Mill., Maidstone, Kent, Inglaterra. Sepharosa 6B y DEAE-Sephadex A-25 se obtuvieron de Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia. Dowex 1X8 era producto Backer Chem. Co., Phillipsburg, N.Y. U.S.A. Las placas de sílica gel para cromatografía en capa fina N^o 6060 se obtuvieron de Eastman Kodak Co., Rochester, U.S.A. Biogel P-300 y Biogel A-1,5 m son productos de BioRad, Calif., U.S.A.

RESULTADOS

A. INHIBICION DE LAS RNA POLIMERASAS POR PIRIDOXAL 5'-FOSFATO Y ANALOGOS

Se estudió el efecto de PLP sobre la actividad de síntesis de RNA de diferentes RNA polimerasas. Para esto se preincubaron: RNA polimerasa de E. coli (0,11 mg/ml), RNA polimerasa I de levadura (0,25 mg/ml), polimerasa I (0,53 mg/ml) y polimerasa II (0,31 mg/ml) de hígado de rata, con diferentes concentraciones de PLP a 30° y en buffer BG MED pH 7,9. A tiempos apropiados se removieron alícuotas de 0,03 ml y se ensayaron las actividades como se indica en Métodos. Los resultados se muestran en las figuras 3,4,5A y 6A para las enzimas de E. coli, levadura y enzimas I y II de hígado de rata respectivamente. Se observa que la inhibición de las enzimas alcanza valores máximos antes de los 10 minutos y el grado máximo de inhibición depende de la concentración de PLP usada. Se encontró que con PLP alrededor de 1 mM, la actividad residual es ínfima. Se consideró de interés estudiar el efecto de análogos de PLP para establecer el grado de selectividad de la inhibición producida por este reactivo. De estos análogos, piridoxamina 5'-fosfato no posee el grupo aldehído, piridoxal carece del grupo fosfato y piridoxina es el de estructura más diferente. Los efectos sobre la enzima de E. coli se muestran en la figura 7, sobre la enzima I de

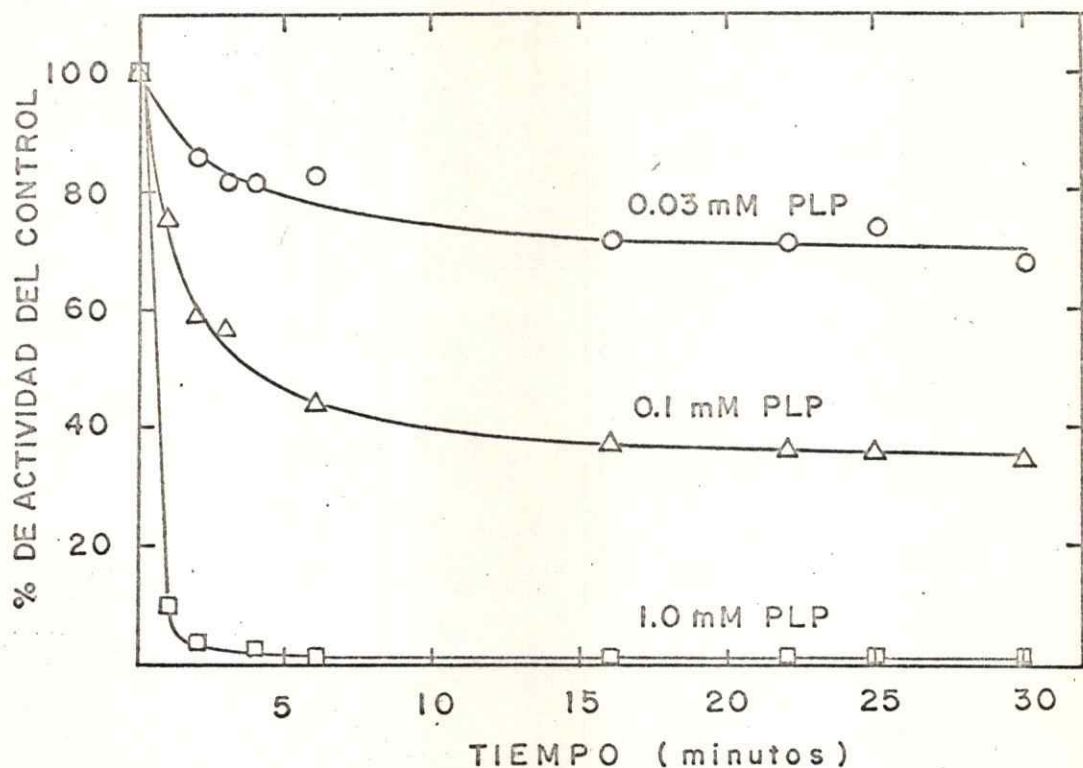


Figura 3. Cinética de inactivación de la RNA polimerasa de E. coli con diferentes concentraciones de PLP.

La reacción de inactivación de la enzima (0,11 mg/ml) con PLP se realizó a 30°C, en un volumen de 0,1 ml usando como tampón barbital 20 mM pH 7,9. A tiempos apropiados se efectuó el ensayo de actividad (enzima 0,018 mg/ml) como se describe en Métodos bajo el título de experimentos cinéticos. El 100% de actividad correspondió a 8,550 cpm, con DNA de bacteriófago T₄ como molde, lo que dió una incorporación de 0,95 nmoles de UMP-³H en el RNA.

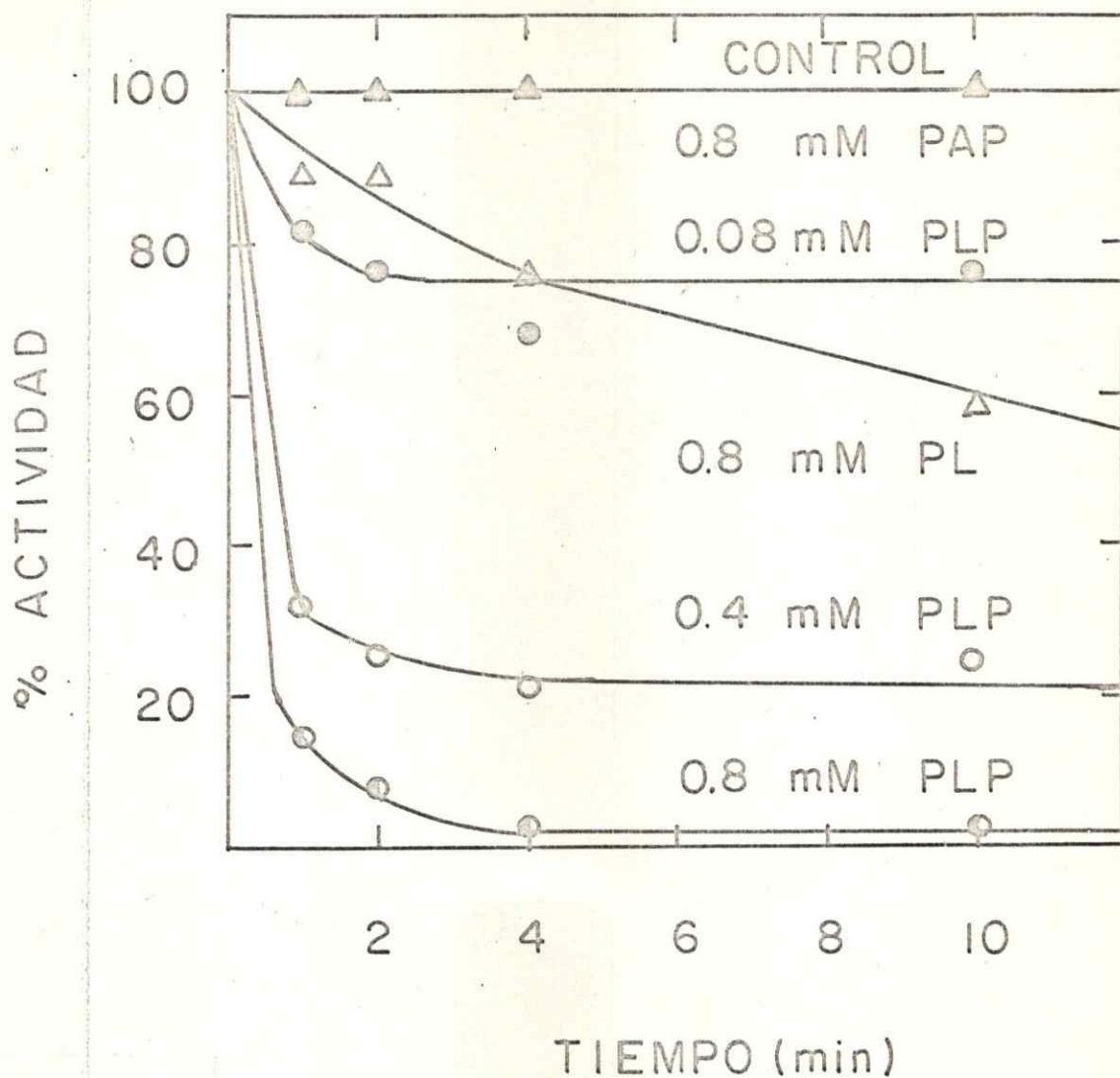


Figura 4. Cinética de inactivación de la RNA polimerasa I de levaduras con diferentes concentraciones de PLP y análogos piridoxal (PL) y piridoxamina 5'-fosfato (PAP).

La reacción de inactivación de la enzima (0,25 mg/ml) con PLP o análogos se realizó en tampón barbital 20 mM pH 7,9 a 30°. A tiempos apropiados se efectuó el ensayo de actividad con alícuotas de 10 μ l como se describe en Métodos. El 100% de actividad corresponde a la incorporación de 0,5 nmoles de UMP-³H en el RNA.

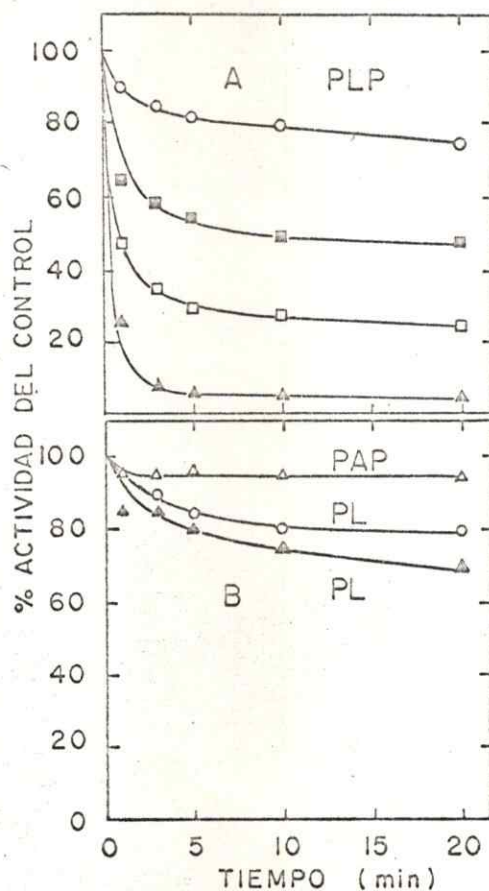


Figura 5. Cinética de inactivación de la RNA polimerasa I de hígado de rata con diferentes concentraciones de PLP, PL y PAP.

La reacción de inactivación de la enzima I (0,53 mg/ml) con PLP se realizó en tampón barbital-HCl 20 mM, pH 7,9 a 30°. A tiempos adecuados se efectuó el ensayo de actividad con alícuotas de 10 μ l como se describe en Métodos. El 100% de actividad correspondió a la incorporación de 0,1 nmol de UMP- 3 H en el RNA.

A: Efecto de la concentración de PLP. ○—○ 0,05 mM;
 ■—■ 0,23 mM; □—□ 0,46 mM; ▲—▲ 0,91 mM.
 B: Efecto de análogos de PLP. ▲—▲ PAP 0,91 mM; ○—○ PL 0,46 mM y ▲—▲ PL 0,91 mM.

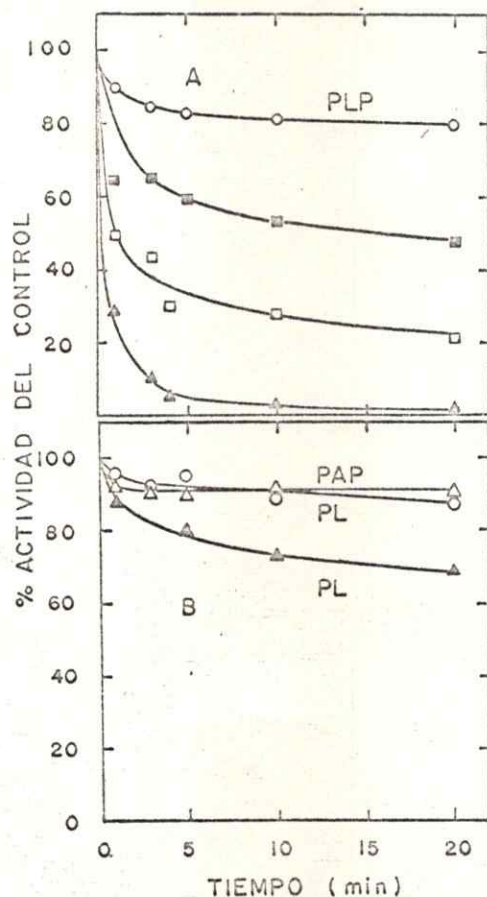


Figura 6. Cinética de inactivación de la RNA polimerasa II de hígado de rata.

La reacción de inactivación de la enzima (0,31 mg/ml) se realizó en tampón barbital-HCl 20 mM, pH 7,9 a 30°. El ensayo de actividad se efectuó a los tiempos indicados con alícuotas de 10 μ l como se describe en Métodos. El 100% de actividad correspondió a la incorporación de 0,12 nmoles de UMP-³H en el RNA.

A: Efecto de la concentración de PLP. ○—○ 0,05 mM; ■—■ 0,23 mM; □—□ 0,46 mM; ▲—▲ 0,91 mM.
 B: Efecto de análogos de PLP. ▲—▲ PAP 0,91 mM; ○—○ PL 0,46 mM y ▲—▲ PL 0,91 mM.

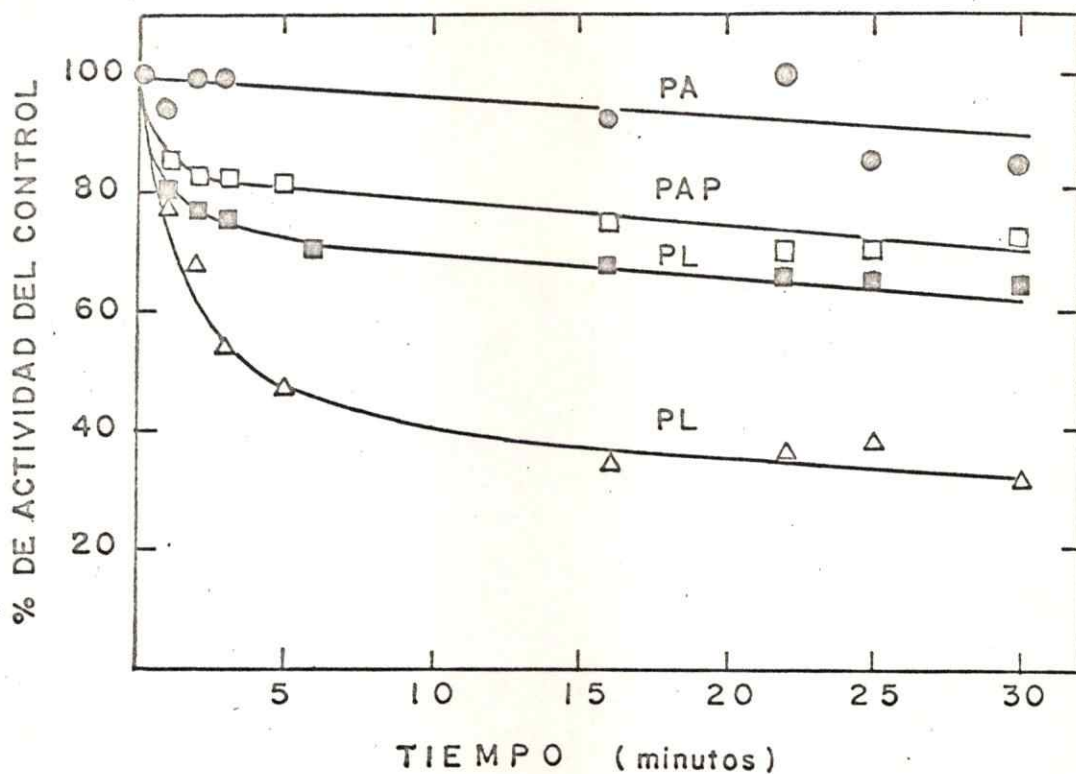


Figura 7. Cinética de inactivación de la RNA polimerasa de E. coli con análogos de PLP.

La reacción de la inactivación de la enzima (0,11 mg/ml) y el ensayo de actividad se realizó en las mismas condiciones descritas en la figura 3.

●—● piridoxina (PA) 1 mM; □—□ PAP 1 mM; ■—■ PL 0,5 mM y Δ—Δ PL 1 mM.

levadura se incluyen en la figura 4 y sobre las enzimas I y II de hígado de rata, en las figuras 5B y 6B respectivamente. Estos datos muestran que la pérdida de actividad es relativamente específica por PLP ya que los análogos piridoxina y piridoxamina 5'-fosfato son, en general, inhibidores muy débiles. Las enzimas son inhibidas en cierto grado por piridoxal, sin embargo, se requieren concentraciones aproximadamente 10-12 veces más altas para lograr una inhibición semejante a la obtenida por PLP.

B. EVIDENCIAS DE FORMACION DE BASE DE SCHIFF EN LA REACCION DE INACTIVACION POR PLP

1. Reversión por aminos y reducción con borohidruro de sodio

Si la reacción entre PLP y enzima ocurre con la participación de grupos amino de las RNA polimerasas, esta debería ser afectada por altas concentraciones de aminos, que competirían con los grupos amino de la enzima por el inhibidor. En efecto, los resultados indican que la inhibición de todas las polimerasas por PLP, es revertida por aminos. La figura 8 muestra la reversión parcial lograda para la enzima de E. coli con Tris-HCl 17,5 mM pH 8,0. Lo mismo se observa en la figura 9 para las enzimas I y II de hígado de rata. Aquí se muestra que etilendiamina 0,05 M revierte la inhibición completamente y en menor grado lo hacen lisina 0,05 M y Tris-HCl 0,05 M. Estos resultados sugieren que la inactivación se debe a la formación de una

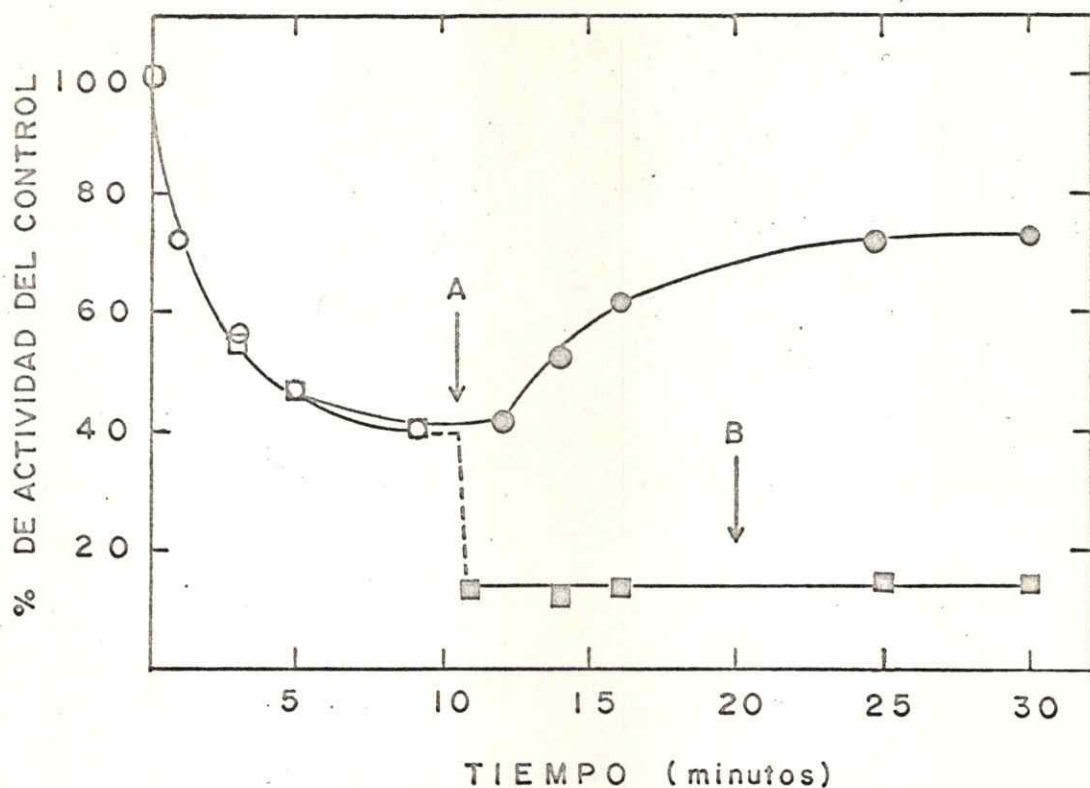


Figura 8. Efecto de NaBH_4 y Tris-HCl en la cinética de inactivación de la RNA polimerasa de *E. coli* con PLP.

La reacción de inactivación de la enzima (0,11 mg/ml) se realizó con PLP 0,1 mM en barbital 20 mM, pH 8,0 a 30°. Al tiempo indicado por la flecha A, una muestra se trató con NaBH_4 2,8 mM (■—■) y otra, con tampón Tris-HCl 17,5 mM, pH 8,0 (●—●). La flecha B indica la adición de Tris-HCl 17,5 mM pH 8,0 a la muestra previamente tratada con NaBH_4 2,8 mM. El ensayo de actividad se realizó como se señala en la figura 3.

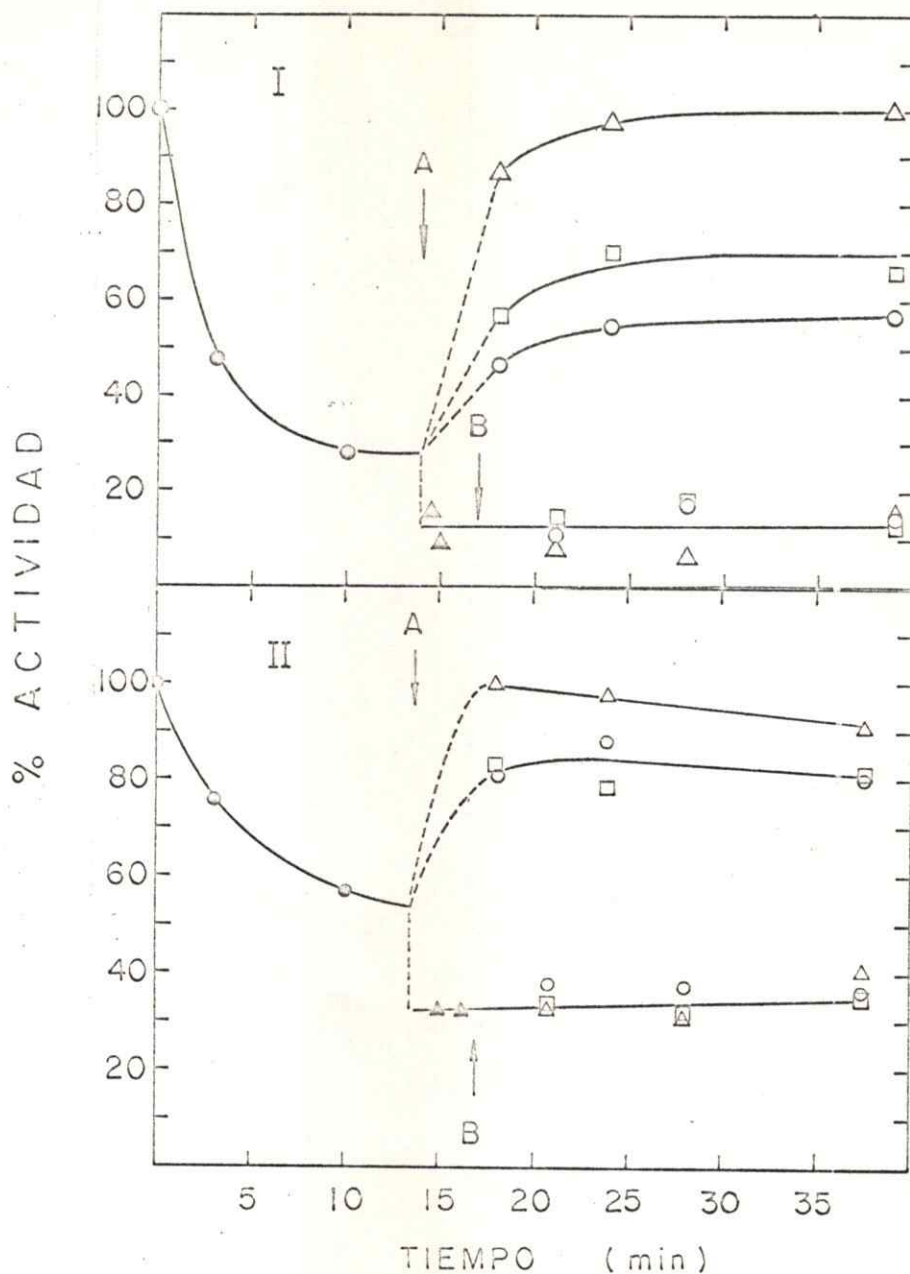


Figura 9. Efecto de NaBH_4 y aminas en la cinética de inactivación de las RNA polimerasas I y II de hígado de rata con PLP.

La reacción de inactivación de las enzimas I y II (ambas 0,38 mg/ml) se realizó con PLP 0,4 mM en tampón barbital, pH 7,9, a 30°. Al tiempo indicado por la flecha A, la muestra se dividió en varias alícuotas que se trataron con etilendiamina 50 mM ($\Delta-\Delta$); L-lisina 50 mM ($\square-\square$); Tris HCl 50 mM, pH 7,9 ($\circ-\circ$) y NaBH_4 1,5 mM ($\blacktriangle-\blacktriangle$). La flecha B indica la adición de los mismos compuestos aminados a alícuotas previamente tratadas con NaBH_4 1 mM. El ensayo de actividad se realizó en las mismas condiciones de las figuras 5 y 6.

base de Schiff entre el grupo aldehído del PLP y uno o más grupos amino de la enzima. Si esta hipótesis es correcta, el complejo enzima-inhibidor debería estabilizarse por reducción con NaBH_4 . Estos resultados se muestran también en las figuras 8 y 9 donde se observa que al agregar NaBH_4 al medio de incubación, se obtiene un mayor grado de inactivación. Luego del tratamiento con el reductor, la adición de aminas (flecha B en las figuras 8 y 9) no logra reactivar las enzimas. Esto indica que el equilibrio se ha desplazado hacia la forma estable del complejo enzima-inhibidor.

2. Espectros de absorción de los productos de reacción entre PLP y RNA polimerasas

Otra evidencia de la formación de una base de Schiff entre las enzimas y PLP se obtuvo al analizar los espectros de diferencia entre 300 y 500 nm entre PLP y RNA polimerasa (de E. coli y levadura) respecto a la misma mezcla en ausencia de enzima. En la figura 10 se muestra que al agregar RNA polimerasa de E. coli a la cubeta de muestra de un par previamente normalizado respecto a su línea base en presencia de PLP, se obtienen cambios espectrales con aparición de bandas de absorción positivas a 335 y 430 nm y una banda negativa a 365 nm. Resultados similares se observan con la enzima I de levadura (figura 11). En este caso, la banda de absorción negativa se ha desplazado a 380 nm.

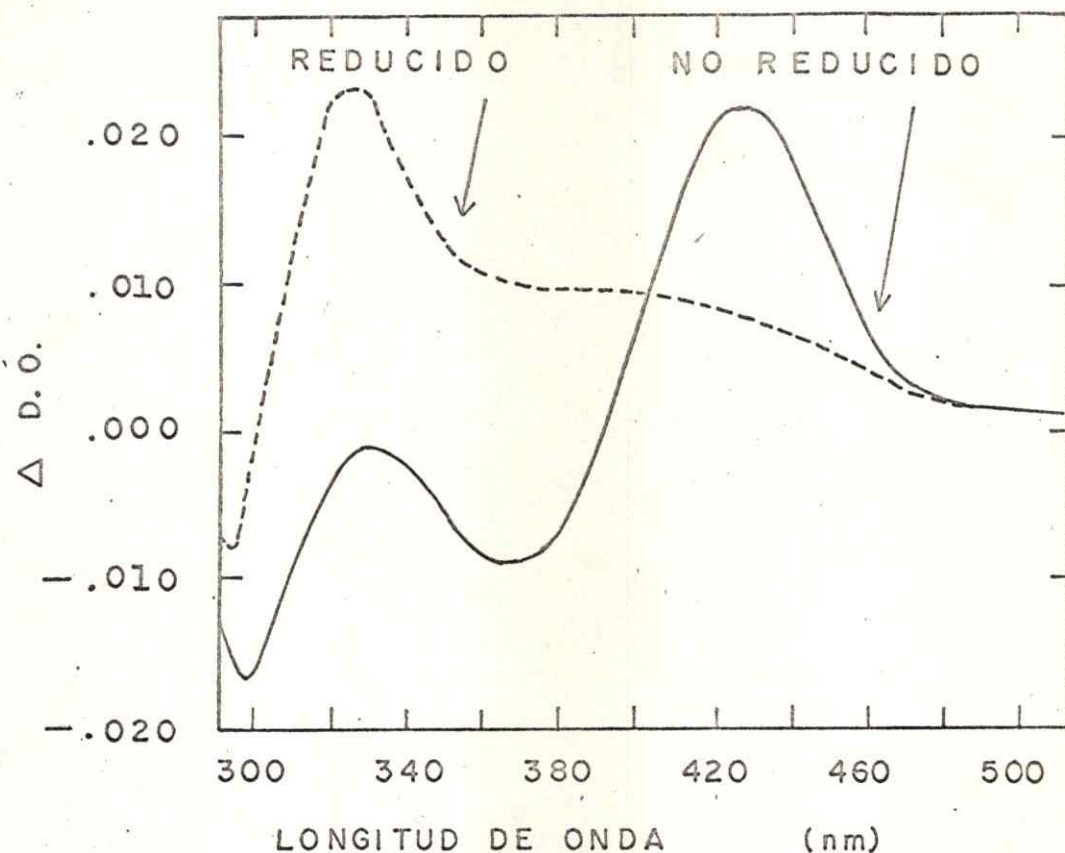


Figura 10. Espectros de diferencia de complejos entre RNA polimerasa de *E. coli* y PLP antes y después de reducir con NaBH_4 .

La enzima (0,22 mg/ml) se incubó en BGMED, pH 8,0 con PLP 0,1 mM por 20 minutos a 30°. La muestra (1 ml) se analizó respecto a una cubeta de referencia que contenía PLP 0,1 mM en BGMED, pH 8,0. El complejo RNA polimerasa-PLP reducido se obtuvo tratando la muestra anterior con NaNH_4 2,4 mM seguida de diálisis exhaustiva contra 5 x 1 lt de tampón fosfato 0,1 M, pH 7,5, que contenía EDTA 0,1 mM, MgCl_2 2 mM, 2-mercaptoetanol 2 mM y glicerol 5%. En este caso la cubeta de referencia contenía enzima tratada en forma similar pero omitiendo PLP. El análisis se realizó en un espectrofotómetro de doble haz, Varian Techtron 635.

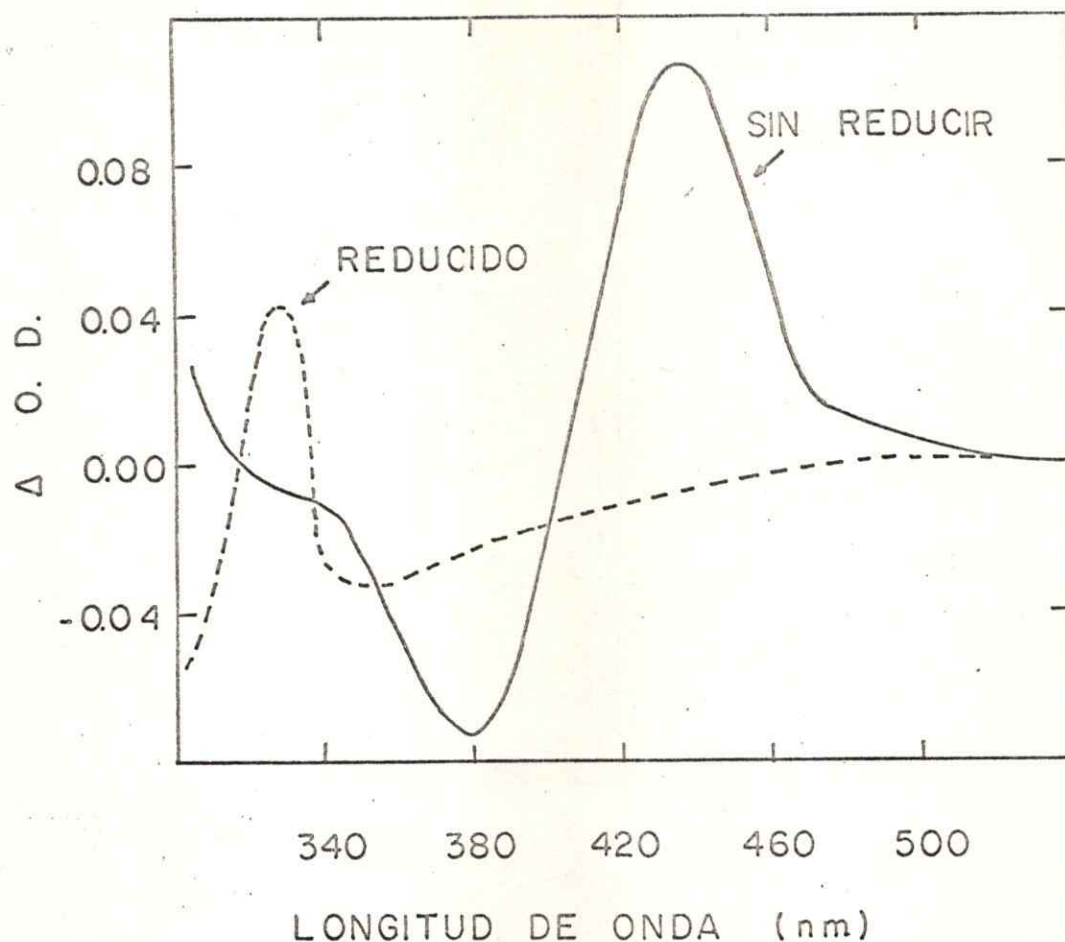


Figura 11. Espectros de diferencia de complejos entre RNA polimerasa I de levaduras y PLP antes y después de reducir con NaBH_4 .

La enzima (0,4 mg/ml) se incubó en BG MED pH 7,9, con PLP 0,2 mM por 10 minutos a 30° . El espectro del complejo no reducido se analizó respecto a una cubeta con PLP 0,2 mM en el mismo tampón. Este complejo se redujo con NaBH_4 0,6 mM, se dializó y se analizó el espectro en igual forma como se describe en la figura 10.

Estos resultados corresponden a la formación de una base de Schiff. La absorbancia a 335 nm se ha atribuido a la presencia de una aldimina no substituída (102) y la absorbancia a 430 a una base de Schiff protonada (103). El espectro de absorción del complejo enzima-PLP reducido muestra una sola banda de absorción a 325 nm tal como se esperaría para N- ϵ -fosfopiridoxil-lisina (104).

C. ESTUDIOS CINETICOS DE LA REACCION ENTRE PLP Y RNA POLIMERASA DE E. COLI

Las velocidades de inactivación de la RNA polimerasa de E. coli por PLP se determinaron a concentración constante de enzima ($3,3 \times 10^{-7}$ M) y se analizó el efecto de diversos parámetros como concentración de PLP, pH, fuerza iónica, temperatura. Gráficos representativos de estos experimentos se muestran en las figuras 12 y 13. En todos los casos, la reacción de inactivación tiene un comportamiento cinético compatible con una reacción de primer orden. Al analizar estos datos en coordenadas de log $(A_t - A_\infty)$ (A_t = % de actividad residual a tiempo t, y A_∞ = % de actividad residual a tiempo infinito) en función del tiempo, se obtuvo gráficos lineales hasta por lo menos 3 vidas medias. Estos se muestran en la figura 14. Las constantes de pseudo primer orden se obtuvieron al multiplicar por 2,303 la pendiente de dichos gráficos.

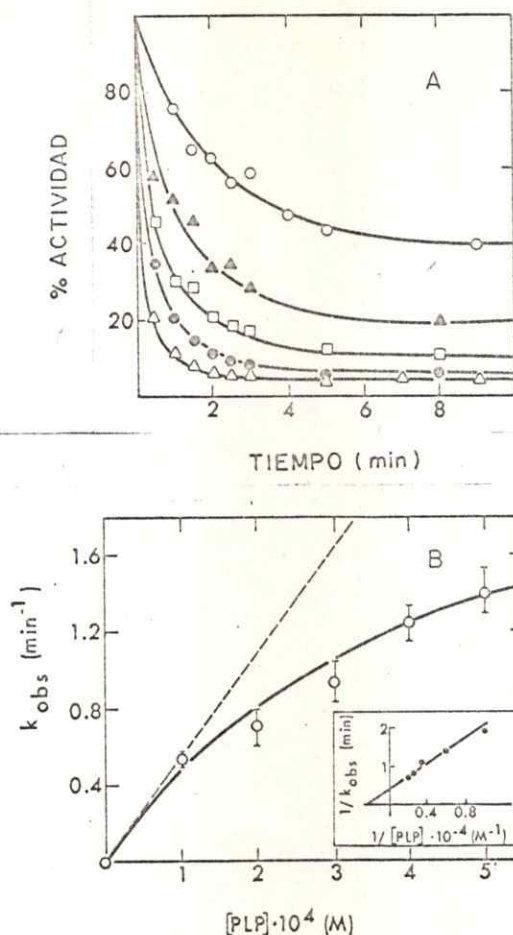


Figura 12. Efecto de la concentración de PLP en la velocidad de inactivación de la RNA polimerasa de *E. coli*.

A. La cinética de inactivación de la enzima (0,18 mg/ml) con PLP se realizó en BG MED pH 8,0 a 30°C. A tiempos apropiados se efectuó el ensayo de actividad con una concentración de enzima de 0,09 mg/ml y usando DNA de bacteriófago T₄ como se señala en Métodos. El 100% de actividad correspondió a 2,4 nmoles de UMP-³H incorporados en el RNA. Las concentraciones de PLP usadas fueron: ○-○ 0,1 mM, △-△ 0,2 mM □-□ 0,3 mM ●-● 0,4 mM y ▲-▲ 0,5 mM.

B. La constante de velocidad observada (k_{obs}) calculada de las pendientes de las curvas anteriores se graficó en función de la concentración de PLP. Las barras corresponden a la desviación estándar obtenida en el cálculo de k_{obs} por el método de los cuadrados mínimos.

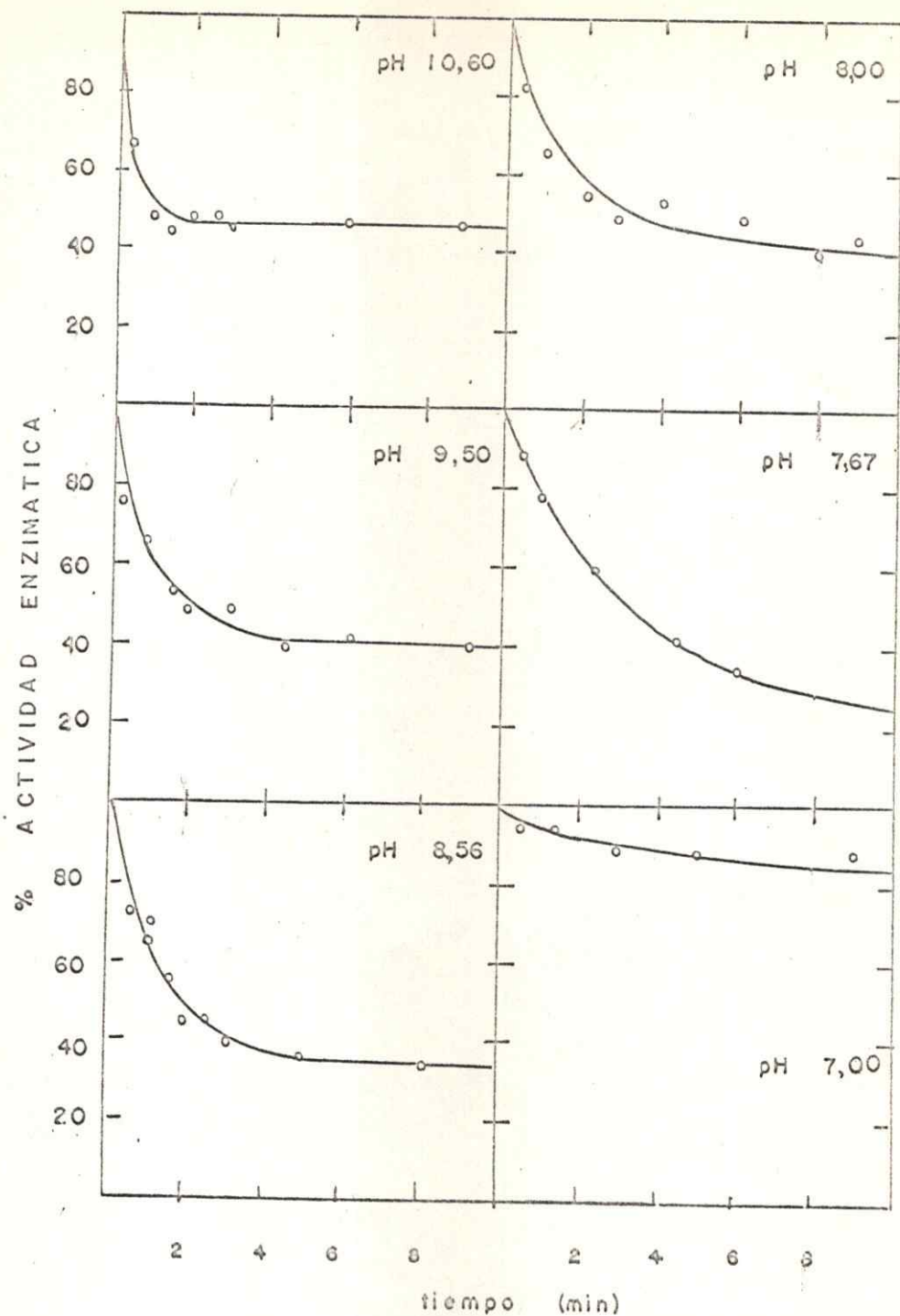


Figura 13. Cinética de inactivación de la RNA polimerasa de *E. coli* con PLP 0,1 mM a diferentes pH.

La reacción de inactivación de la enzima (0,18 mg/ml) se realizó en tampones imidazol-HCl (pH 7,0), barbital-HCl (pH 7,67; 8,00 y 8,56) y Na_2CO_3 - NaHCO_3 (pH 9,50 y 10,60) a fuerza iónica constante ($\mu = 0,05$) como se señala en Métodos bajo el título experimentos cinéticos. El ensayo de actividad se realizó a pH 8,0, con DNA de bacteriófago T_4 como molde y enzima 0,09 mg/ml. El 100% de actividad correspondió a 2,4 nmoles de UMP- ^3H incorporados en el RNA a pH 8,0.

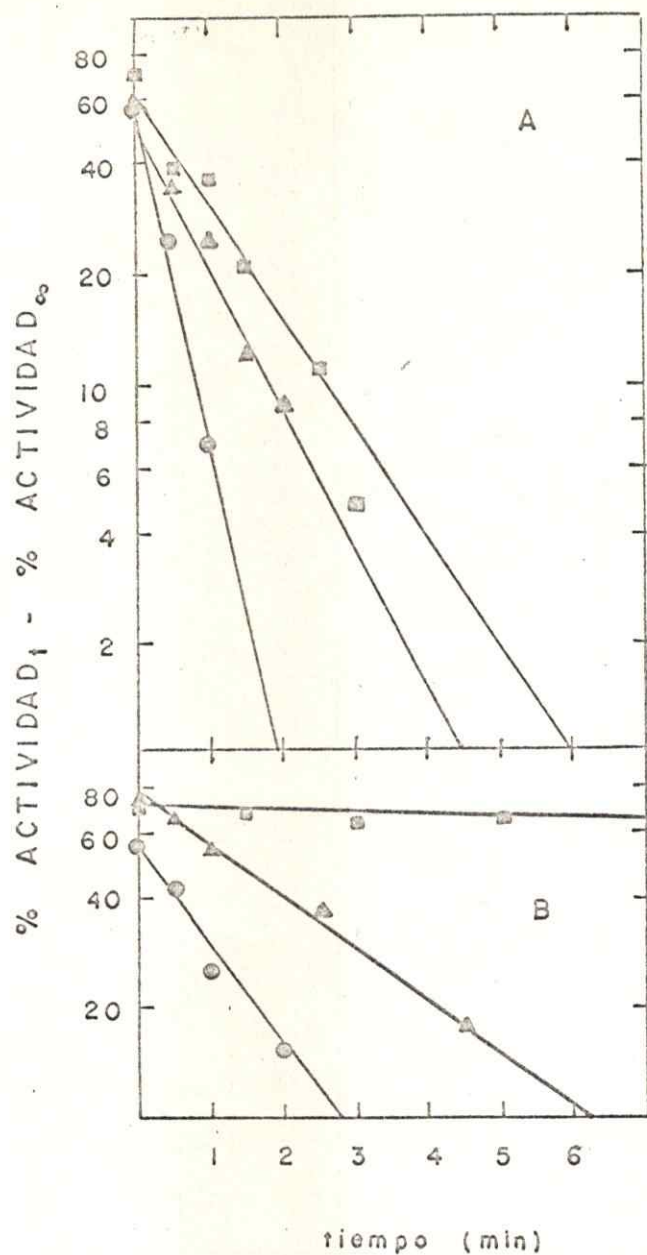


Figura 14. Gráficos de pseudo primer orden para la inactivación de la RNA polimerasa de *E. coli* con PLP 0,1 mM a diferentes pH.

Se obtuvieron por representación logarítmica de las diferencias entre el % de actividad a tiempo t y el % de actividad a tiempo ∞ ($\% A_t - \% A_{\infty}$) en función del tiempo, a partir de los gráficos de la figura 13.

A ●—● pH 10,60

▲—▲ pH 9,50

■—■ pH 8,56

B ●—● pH 8,00

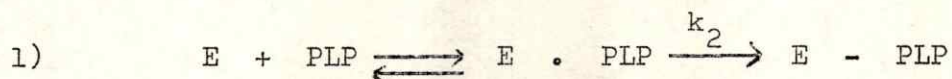
▲—▲ pH 7,67

■—■ pH 7,00

1. Efecto de la concentración de PLP

Para este estudio se midieron las constantes de velocidad de inactivación a concentraciones de PLP que variaron entre 1×10^{-4} M y 5×10^{-4} M, a pH 8,0, en tampón barbital, como se indica en Métodos, bajo el título de experimentos cinéticos. Los resultados se muestran en la figura 12. Los puntos experimentales se ajustan mejor a una hipérbola que a una recta (línea punteada en la figura 12 B). De esto se desprende que a las concentraciones de PLP usadas es posible detectar cinéticamente la formación de un complejo enzima-inhibidor previo a la formación de la base de Schiff. Esta existencia es también sugerida por el hecho que PLP es diez veces mejor inhibidor de la polimerasa de E. coli que piridoxal.

La siguiente secuencia daría cuenta de la reacción:



El efecto de saturación sería claramente observable a concentraciones de PLP cercanas a 1×10^{-3} M, pero desgraciadamente no puede medirse la constante en estas condiciones por ser la reacción demasiado rápida y llegar a un % de inactivación muy alto.

La ecuación que rige el proceso de saturación es:

$$2) \quad k_{\text{obs}} = \frac{k_2 \text{ PLP}}{K + \text{PLP}}$$

A baja concentración de PLP (1×10^{-4} M) en que aún no se ha llegado a la completa saturación, la ecuación anterior queda transformada en:

$$3) \quad k_{\text{obs}} = \frac{k_2}{K} \text{ PLP}$$

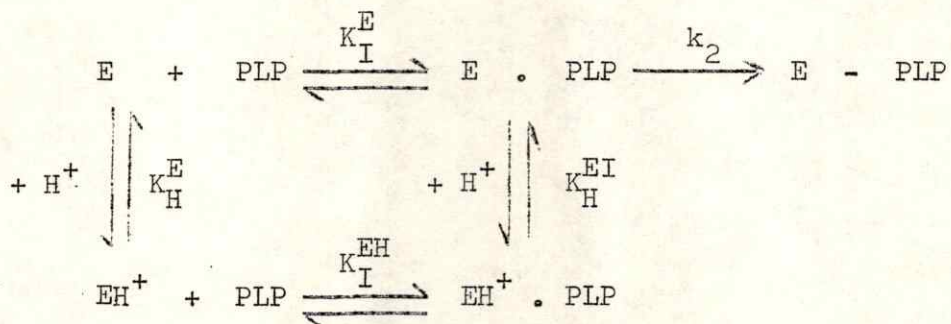
y el cociente k_2/K corresponde a una constante cinética de 2º orden con un valor igual a $3,4 \times 10^3 \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (pendiente de la línea punteada de la figura 12 B).

Usando un gráfico de dobles recíprocos es posible calcular a partir de la ecuación (1) valores de K y k_2 . Este análisis se muestra en el ángulo inferior derecho de la figura 12 B. Se obtuvo un valor de 4×10^{-4} M para K y $2,4 \text{ min}^{-1}$ para k_2 . El cociente k_2/K obtenido a partir de estos datos es $6,0 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$, valor que resulta muy similar al cociente k_2/K obtenido experimentalmente ($5,4 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$) a baja concentración de PLP (1×10^{-4} M).

2. Efecto del pH

Las velocidades de inactivación de la RNA polimerasa de E. coli a distintos pH se determinaron a concentración constante de enzima ($3,3 \times 10^{-7}$ M) y concentración constante de PLP (1×10^{-4} M) y fuerza iónica constante ($\mu = 0,05$). A tiempos apropiados se sacaron alícuotas, las que se ensayaron para actividad RNA polimerásica a pH 8,0. Los gráficos representativos de estos experimentos se muestran en la figura 13. En todos los

casos, la reacción de inactivación se ha realizado en ausencia de reductor y tiene un comportamiento cinético compatible con una reacción de primer orden (figura 14). Las constantes de pseudo primer orden se obtuvieron al multiplicar por 2,303 la pendiente de dichos gráficos y se muestran en la tabla 1. Al analizar estos resultados en un gráfico de k_{obs} versus pH se obtiene una curva bifásica, representada en la figura 15. La velocidad de inactivación es bajísima entre pH 5 y 7 para luego aumentar y hacerse relativamente constante entre pH 8,5 y 9,5. Sobre pH 9,5 la velocidad de inactivación aumenta nuevamente. Los valores entre pH 5 y 9,5 semejan una curva de titulación y pueden interpretarse como la dependencia de la velocidad de inactivación de la base conjugada de un grupo ionizable de la enzima o PLP, participante en la reacción de inactivación. Suponiendo que este es un grupo de la enzima, por razones que se discutirán posteriormente, la reacción se puede ajustar al siguiente modelo:



En la situación más simple, $K_I^E = K_I^{EH}$ y se obtiene (ver apéndice):

$$4) \quad k_{obs} = k_{obs}^{lim} \frac{K_H^{EI}}{K_H^{EI} + [H^+]}$$

Tabla 1. Valores de las constantes de velocidad para la reacción de inactivación por PLP de la RNA polimerasa de E. coli

pH	Tampón	k_{obs} (min ⁻¹)
4,00	acetato	0,00
4,70	"	0,00
5,00	"	0,00
5,00	fosfato	0,00
6,02	"	0,00
6,21	imidazol	0,008 + 0,012
6,51	"	0,003 ++ 0,009
6,51	"	0,031 +++ 0,016
6,80	"	0,044 +++ 0,008
7,00	"	0,002 +++ 0,017
7,00	fosfato	0,019 +++ 0,009
7,67	barbital	0,330 +++ 0,100
7,72	imidazol	0,172 +++ 0,030
8,00	barbital	0,600 +++ 0,052
8,00	"	0,707 +++ 0,046
8,56	"	0,695 +++ 0,052
8,56	"	0,680 +++ 0,086
8,56	"	0,815 +++ 0,230
8,82	"	0,887 +++ 0,073
8,82	"	0,830 +++ 0,138
9,51	carbonato	0,889 +++ 0,100
9,51	"	0,760 +++ 0,092
9,51	"	0,962 +++ 0,129
10,60	"	2,085 +++ 0,079
10,60	"	1,704 +++ 0,070
10,60	"	2,089 - 0,291

La concentración de PLP fue 0,1 mM y la de enzima 0,18 mg/ml. La inactivación se realizó a 30°. Los tampones se usaron a fuerza iónica constante ($\mu = 0,05$). Otros detalles se explican en Métodos bajo el título de experimentos cinéticos.

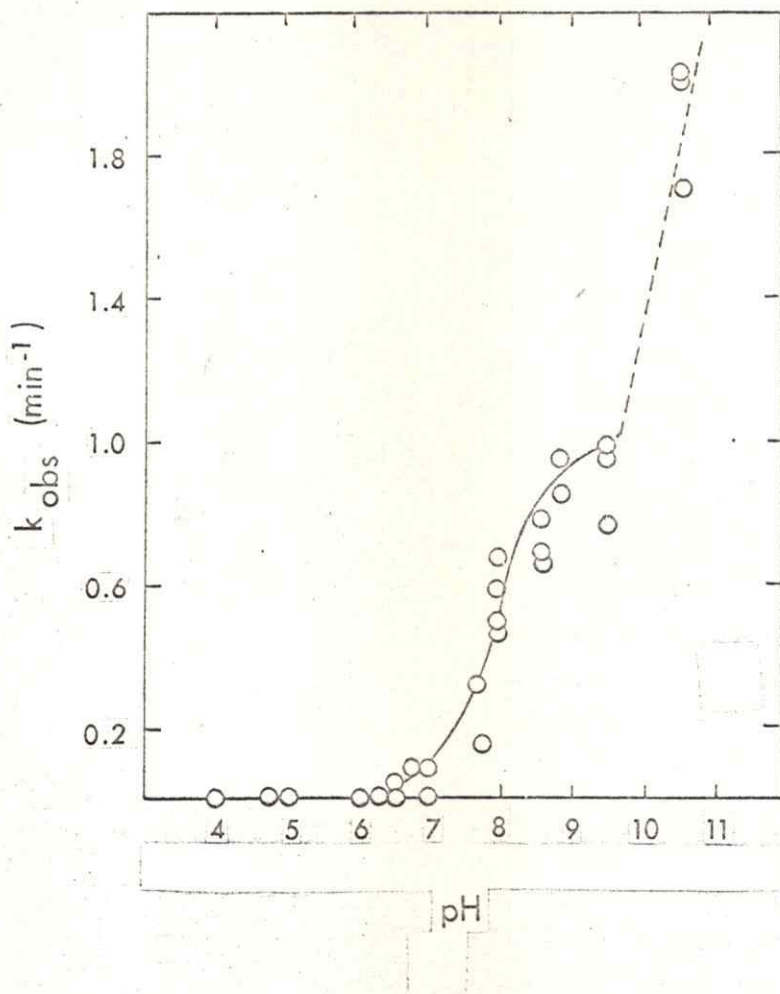


Figura 15. Efecto del pH en la constante de velocidad observada (k_{obs}) para la reacción de inactivación de la RNA polimerasa de *E. coli* con PLP 0,1 mM.

Los tampones usados se detallan en la Tabla 1 y la cinética de inactivación se analiza como se describe en la figura 13. Los valores de k_{obs} se obtuvieron de las pendientes de los gráficos de pseudo primer orden como los de la figura 14. La línea sólida corresponde a una curva teórica calculada usando los valores de $k_{lim} = 1,0 \text{ min}^{-1}$ y $K_H = 1,26 \times 10^{-8}$ (pK_a 7,9) en la ecuación 4 de la página. 79.

Los puntos experimentales de la primera parte de la curva se ajustan bien a una curva teórica calculada a partir de la ecuación anterior empleando los valores de $k_{\text{obs}}^{\text{lím}} = 1,0 \text{ min}^{-1}$ y $K_{\text{H}}^{\text{EI}} = 1,26 \times 10^{-8} \text{ M}$ ($\text{p}K_{\text{a}} 7,9$), como se observa en la figura 15. El ajuste también es válido, aunque en menor grado, si se suponen 2 grupos ionizables de $\text{p}K_{\text{a}} 7,9$. En esta misma figura se muestra que sobre pH 9,5 el valor de k_{obs} incrementa bruscamente (línea de trazos). Este aumento en la velocidad de inactivación a pH alcalino ocurre probablemente porque en estas condiciones reaccionan además otros grupos aminos de la enzima.

3. Efecto de fuerza iónica

Con el objeto de obtener información sobre el posible mecanismo y sitio físico de la reacción de inactivación, se estudió el efecto que pudiera tener la fuerza iónica del medio sobre la reacción de inactivación. Con este fin se agregó $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en concentraciones determinadas al medio de reacción, a pH 8,6. Las alícuotas para la determinación de actividad se diluyeron adecuadamente de tal modo que todos los ensayos de actividad enzimática se realizaron a una misma fuerza iónica. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 16. Ellos muestran que la constante de velocidad de inactivación disminuye apreciablemente al aumentar la fuerza iónica hasta hacerse cero a fuerzas iónicas iguales o superiores a 1,0.

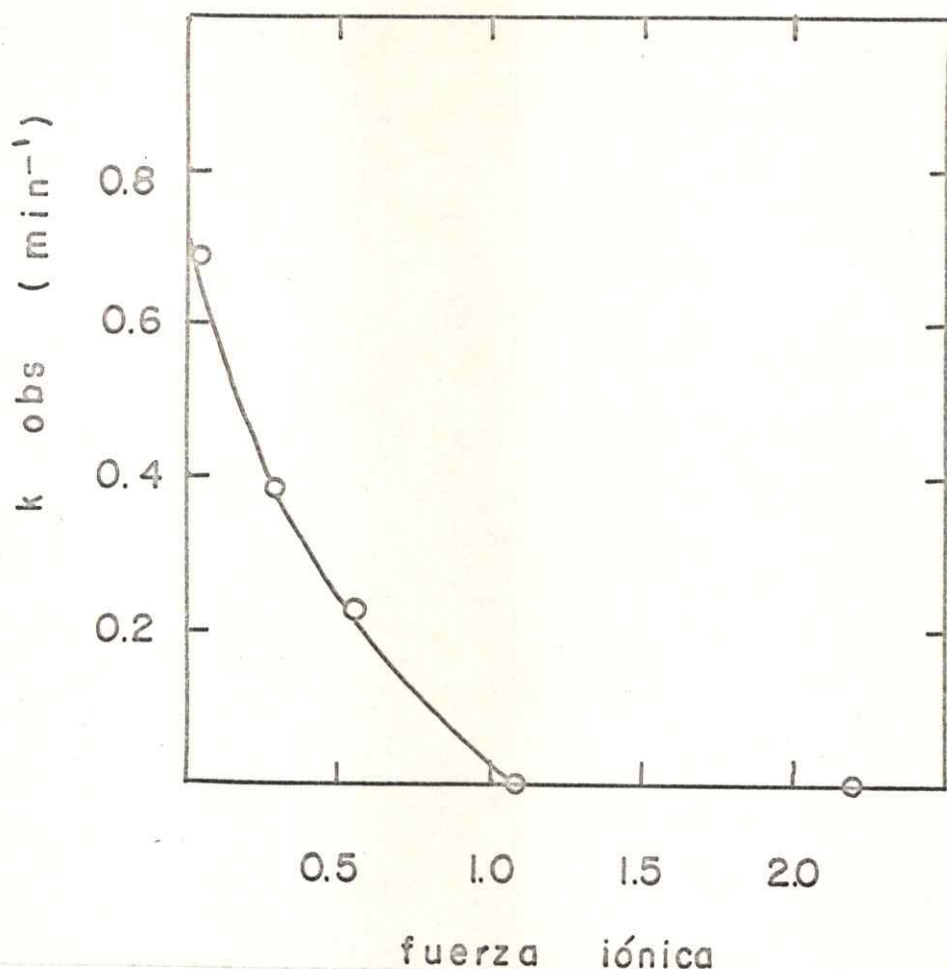


Figura 16. Efecto de la fuerza iónica en la k_{obs} de la reacción de inactivación de la RNA polimerasa de E. coli con PLP 0,1 mM.

La reacción de inactivación de la enzima (0,18 mg/ml) con PLP 0,1 mM se realizó en BG MED pH 8,6 a 30°. La fuerza iónica se ajustó con sulfato de amonio y la actividad se ensayó previa dilución para obtener una fuerza iónica constante ($\mu = 0,1$), con DNA de bacteriófago T_4 como molde. Los valores de k_{obs} se calcularon como se indica en la figura 15. El 100% de actividad correspondió a la incorporación de 2,3 nmoles de UMP- ^3H en el RNA.

4. Efecto de la temperatura en la reacción de modificación y efecto del tipo de DNA usado en el ensayo de actividad residual

Para analizar estos efectos se incubó la RNA polimerasa de E. coli (0,11 mg/ml) con PLP 0,1 mM en tampón barbital-HCl pH 8,0 como se indica en Métodos (experimentos cinéticos). La reacción de inactivación por PLP se realizó a 0°, 30° y 37° y la actividad residual se determinó a 37°, usando DNA de bacteriófago T₄ como molde. Los resultados se muestran en la figura 17 e indican que al aumentar la temperatura se produce un aumento en la velocidad y en el grado de inactivación de la enzima. Luego de reducción con NaBH₄ 2 mM se alcanza un grado de inactivación semejante, del orden del 90%. Para determinar el efecto del tipo de DNA usado en el ensayo de actividad residual se incubó RNA polimerasa de E. coli (0,11 mg/ml) con PLP 0,1 mM) en barbital pH 8,0, a 37° y se analizó la cinética de inactivación con DNA de timo de ternera, DNA de bacteriófago T₄ y con poli d(AT). La figura 18 muestra que el grado de inactivación medido es algo dependiente del poli nucleótido usado como molde en el ensayo de actividad, siendo más notoria la inactivación al utilizar DNA de bacteriófago T₄. Después de reducción con NaBH₄ 2 mM esta diferencia es menos notoria obteniéndose valores de aproximadamente 90% de inactivación.

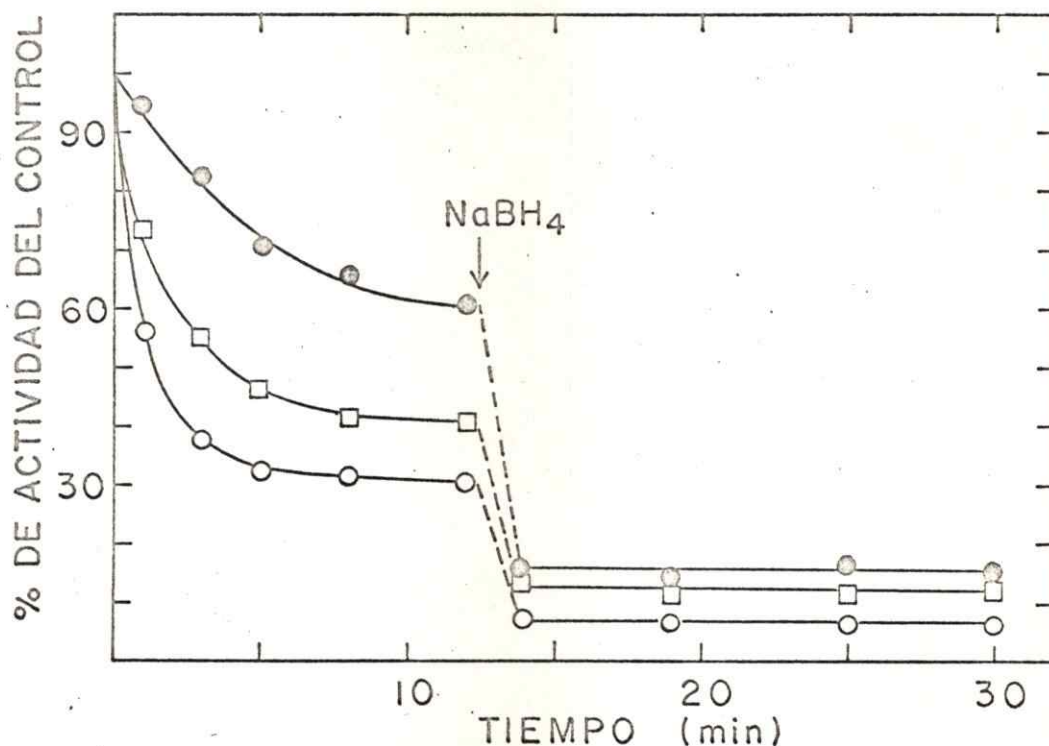


Figura 17. Cinética de inactivación de la RNA polimerasa de *E. coli* con PLP 0,1 mM a distintas temperaturas.

La enzima (0,11 mg/ml) se inactivó en BGMED, pH 8,0 a 0°C (●—●), 30°C (□—□) y 37°C (○—○). Al tiempo indicado por la flecha, el complejo enzima-PLP se redujo con NaBH₄ 2 mM. El ensayo de actividad se realizó a 37°C con una concentración de enzima de 0,018 mg/ml y usando DNA de bacteriófago T₄ como molde. El 100% de actividad incorporó 1,1 nmoles de UMP-³H en el RNA.

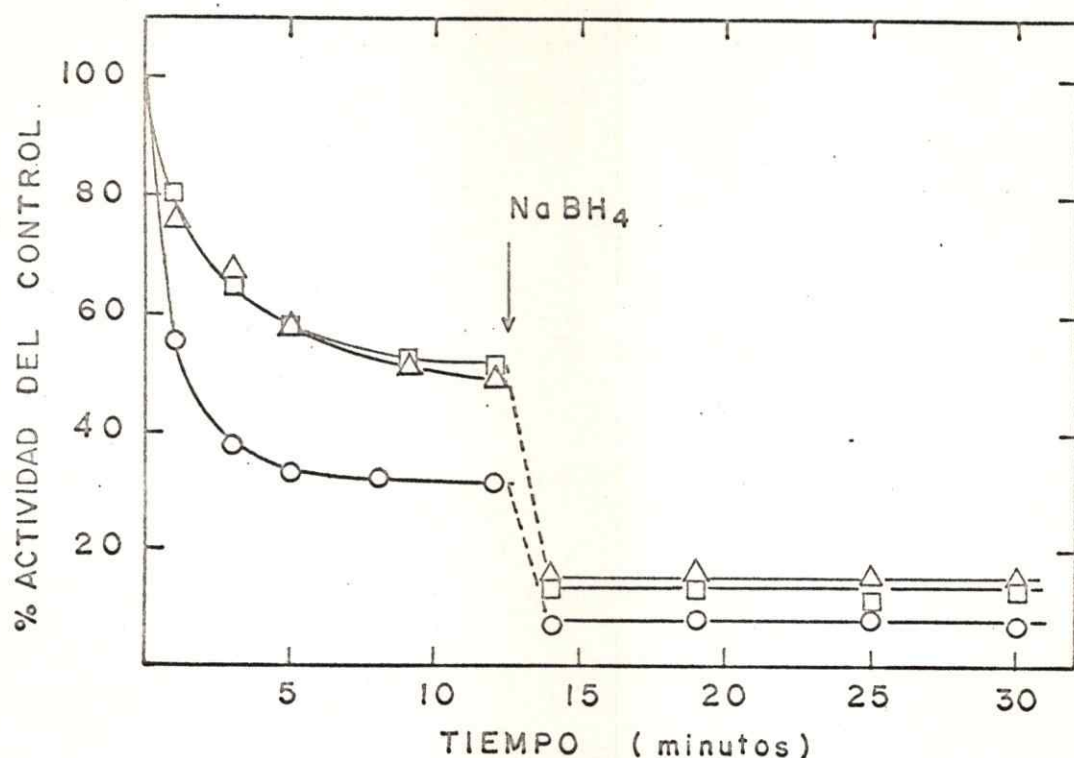


Figura 18. Cinética de inactivación de la RNA polimerasa de *E. coli* con PLP 0,1 mM usando diferentes polinucleótidos en el ensayo de actividad residual.

La enzima (0,11 mg/ml) se inactivó a 37° en BGMED, pH 8,0. Al tiempo indicado por la flecha se redujo con NaBH₄ 2 mM en frío. El ensayo de actividad residual se realizó con DNA de bacteriófago T₄ 0,15 mg/ml (○—○); DNA de timo de ternero 0,17 mg/ml (△—△) y poli d(AT) 0,13 mg/ml (□—□). El 100% de actividad correspondió a la incorporación de 1,06 nmoles de UMP-³H en el RNA con DNA de bacteriófago T₄, 0,72 nmoles con DNA de timo de ternero y 1,73 nmoles con poli d(AT) como moldes.

D. DETERMINACION ESPECTROFOTOMETRICA DE LA CINETICA DE FORMACION DE BASE DE SCHIFF

1. Reacción entre PLP y RNA polimerasa de E. coli

La reacción entre RNA polimerasa y PLP involucra la formación de una base de Schiff, que tiene un máximo de absorción a 430 nm como se mostró en la figura 10. Fue de interés observar y medir directamente esta reacción en un espectrofotómetro. Con este objeto se mezcló en la cubeta de reacción RNA polimerasa de E. coli ($3,3 \times 10^{-7}$ M) y PLP (1×10^{-4} M) en tampón barbital pH 8,6 (las otras condiciones fueron similares a las especificadas en Métodos bajo el título experimentos cinéticos). Se usó un espectrofotómetro Varian Techtron 635. Las cubetas de referencia contenían en igual volumen (1 ml) lo mismo que la cubeta de reacción, menos la enzima. Inmediatamente después de mezclar los reaccionantes, se observó un aumento de absorbancia a 430 nm, fenómeno que procedió exponencialmente y se completó a los 5 minutos. El trazado del inscriptor del espectrofotómetro se presenta en la figura 19. Los datos se ajustan bien a una reacción de primer orden con una constante de velocidad $k_{obs} = 0,99 \text{ min}^{-1}$.

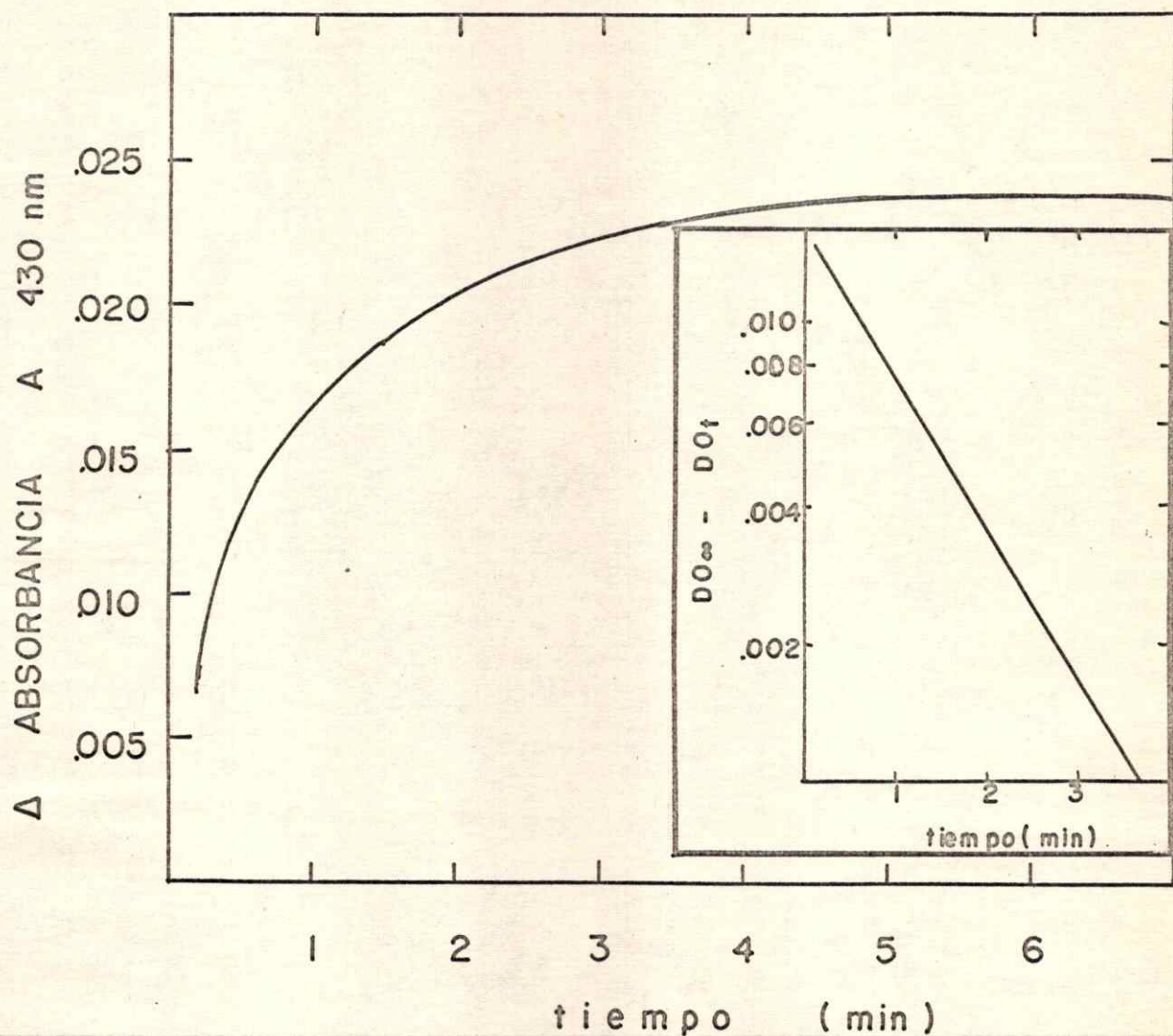


Figura 19. Cinética de formación de base de Schiff entre PLP y RNA polimerasa de *E. coli*.

Se incubó RNA polimerasa 0,18 mg/ml en barbital-HCl 20 mM, pH 8,6, a 30° con PLP 0,1 mM. Se midió el incremento de absorbancia a 430 nm en un espectrofotómetro Varian Techtron 635. La cubeta de referencia contenía PLP 0,1 mM en el mismo tampón. Otros detalles se indican en Métodos, experimentos cinéticos, párrafo 4. En el recuadro derecho se incluye el gráfico semilogarítmico para el cálculo de la constante de velocidad k_{obs} .

2. Reacción entre PLP y DNA, sustratos y otros compuestos con grupos amino

Considerando que el grupo aldehído del PLP puede formar una base de Schiff con cualquier grupo amino presente, se exploró la posibilidad de que el DNA y algunos sustratos de la enzima tuvieran disponibles algunos grupos amino y éstos pudieran reaccionar con PLP. Para esto se observó la formación de bases de Schiff a 430 nm al incubar ATP, GTP y CTP como sustratos aminados de la enzima y DNA de timo de ternera y de bacteriófago T₄ en las concentraciones usadas en el ensayo de actividad, con PLP 0,1 mM a pH 8,0. Los resultados se muestran en la figura 20. No se observa ningún cambio detectable en la absorbancia a 430 nm que indiquen formación de base de Schiff en estos casos. Sin embargo, al emplear una solución de Tris-HCl o lisina a pH 8,0 con una concentración de grupos amino de 0,2 mM, similar a la del DNA usado en los ensayos, se observa una clara aparición de absorbancia a 430 nm en el tiempo. Se incluye además, a modo de comparación la cinética entre PLP 0,1 mM y RNA polimerasa de E. coli (0,18 mg/ml). Estos resultados concuerdan con los de otros autores que indican que los grupos amino de las bases del DNA de doble hebra no están accesibles para la reacción con formaldehído en medio acuoso, a pH neutro (105). Esto se explica por la participación de los grupos amino en la mantención de la estructura secundaria del DNA. Se concluye también que los grupos amino existentes en las bases púricas y pirimídicas de los

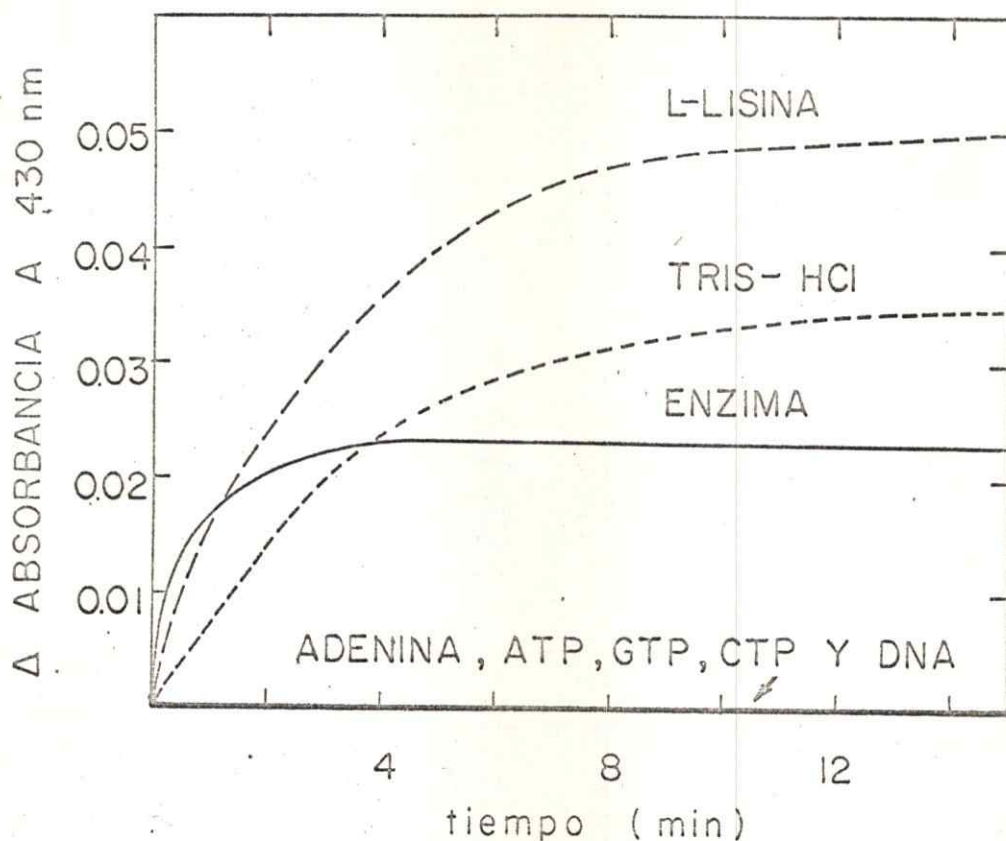


Figura 20. Cinética espectrofotométrica de la reacción entre PLP y DNA, sustratos y otros compuestos con grupos amino.

Se midió el incremento de absorbancia a 430 nm en un espectrofotómetro Cary modelo 118 C. Se incubó en la cubeta de muestra PLP 0,1 mM en barbital-HCl 20 mM, pH 8,0, a 30°, alternativamente con: DNA de bacteriófago T₄ 0,15 mg/ml; DNA de timo de ternero 0,15 mg/ml; ATP 1 mM; GTP 1 mM; CTP 1 mM; Adenina 1 mM; Tris-HCl 0,2 mM, pH 8,0; y L-lisina 0,1 mM. A modo de comparación se incluye la cinética obtenida con RNA polimerasa de *E. coli* 0,18 mg/ml. En todos los casos, la cubeta de referencia contenía PLP 0,1 mM en el mismo tampón.

sustratos no reaccionan con PLP, en las condiciones descritas.

E. IDENTIFICACION DE LOS RESIDUOS DE RNA POLIMERASA MODIFICADOS POR PLP

Las evidencias cinéticas antes presentadas, como también los estudios espectrales, sugieren la participación de grupos amino de la enzima en la reacción con PLP. Los estudios de pH indican que el grupo modificado tiene un pK_a cercano a 7,9. La demostración de que el grupo reaccionante con PLP corresponde a un ϵ -amino de lisina se obtuvo mediante análisis directo de hidrolizados de enzima-PLP por electroforesis de alto voltaje y cromatografía en papel. Para este objeto se incubó RNA polimerasa de E. coli (3 mg) o bien, polimerasa I de levaduras (2 mg) en tampón BGMED pH 7,9 con PLP 0,1 mM por 30 minutos a 37°. Luego se redujo la base de Schiff formada con $NaB-^3H_4$ 1 mM (actividad específica de 250 Ci/mol) a 0°. Luego de diálisis exhaustiva e hidrólisis ácida total, las muestras se analizaron con electroforesis de alto voltaje y cromatografía en papel. Los resultados obtenidos con la enzima de E. coli se muestra en la figura 21 y los resultados con la enzima I de levadura, se presentan en la figura 22. En ambos casos y por los dos métodos se obtuvo sólo una mancha radiactiva cuya migración correspondió exactamente a la migración de un patrón de N- ϵ -piridoxil-lisina preparado por síntesis química en el laboratorio.

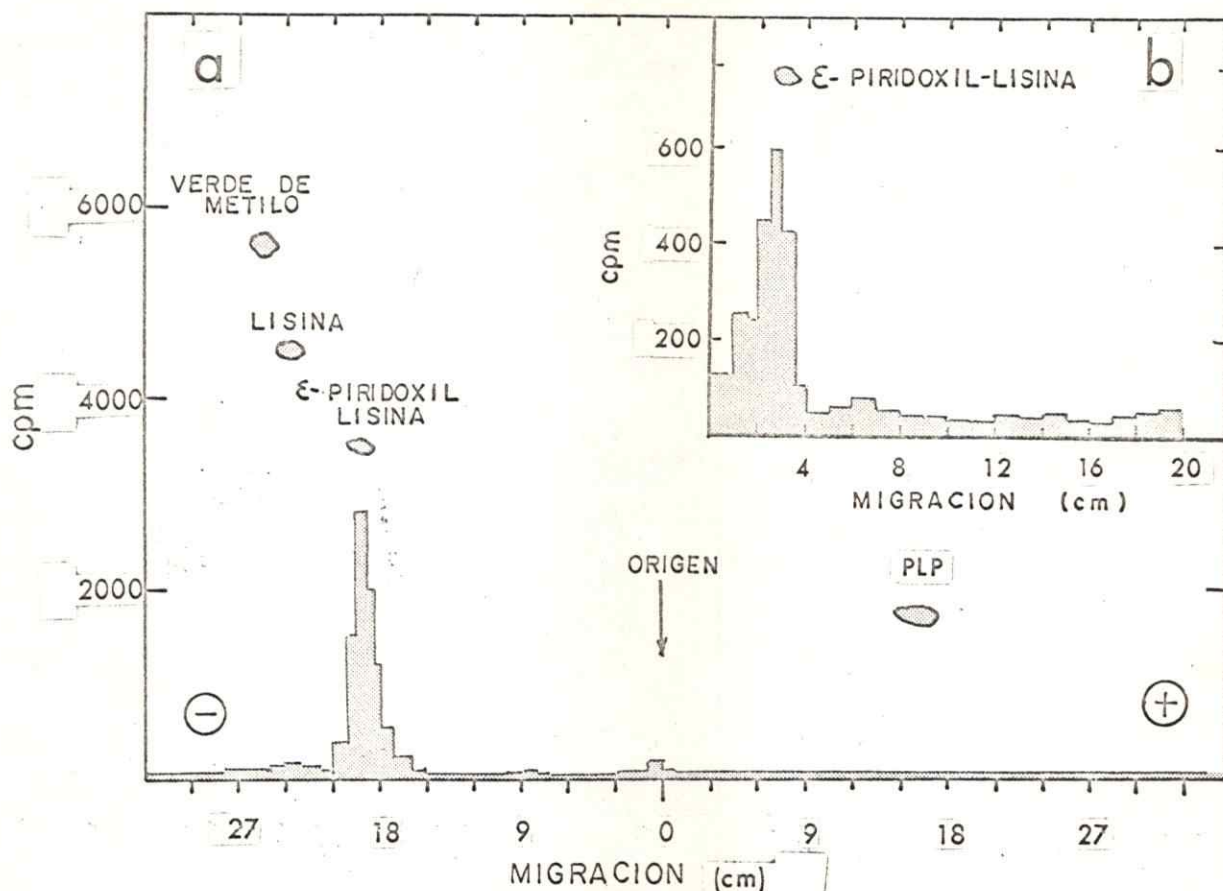


Figura 21. Identificación de N- ϵ -piridoxil-lisina como el residuo aminoacídico de RNA polimerasa de *E. coli* modificado por PLP.

La enzima (3mg) se incubó en BGMED pH 7,9 con PLP 0,1 mM por 30 minutos a 37°. Luego se redujo con NaB- 3 H $_4$ 1 mM, se dializó y se sometió a hidrólisis ácida total. Alícuotas del hidrolizado se analizaron como sigue:

- Electroforesis de alto voltaje en piridina-ácido acético-agua (1:10:89 v/v), pH 3,5.
- Cromatografía en papel en butanol-piridina-ácido acético-agua (30:30:6:24 v/v).

Otros detalles y la preparación del estándar N- ϵ -piridoxil-lisina se indican en Métodos.

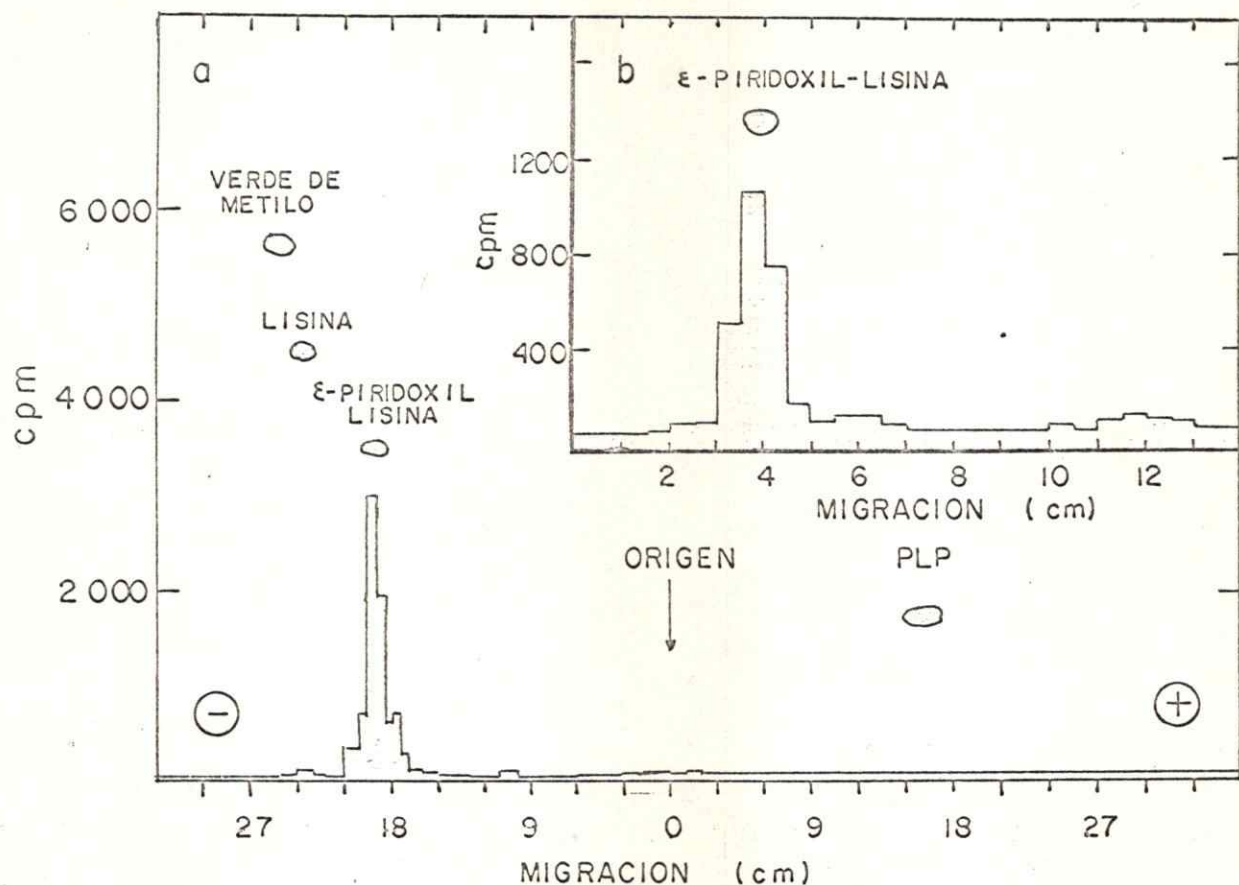


Figura 22. Identificación de N- ϵ -piridoxil-lisina como el residuo aminoacídico de la RNA polimerasa I de levaduras modificado por PLP. La enzima (2 mg) se incubó en BG MED pH 7,9 con PLP 0,2 mM por 30 minutos a 37°. Se redujo con NaB- 3 H₄ 1 mM, se dializó e hidrolizó totalmente con HCl.

- A. Electroforesis de alto voltaje en piridina-ácido acético-agua (1:10:89 v/v), pH 3,5
- B. Cromatografía en papel en butanol-piridina-ácido acético-agua (30:30:6:4 v/v). Otros detalles son idénticos a los de la figura 21.

La detección de otros aminoácidos modificados por PLP sería claramente observable por electroforesis de alto voltaje en las condiciones descritas, ya que N- ξ -piridoxil-lisina tiene el grupo α -amino protonado a pH 3,5 y por esto se desplaza rápidamente hacia el cátodo. Los otros aminoácidos pueden reaccionar con PLP a través del grupo α -amino terminal de las cadenas polipeptídicas. Aunque el derivado N- α -piridoxil-arginina tiene grupos amino protonados a pH 3,5 y podría migrar como N- ξ -piridoxil-lisina, el sistema descrito discrimina entre ellos.

F. EFECTO DE LA MODIFICACION CON PLP SOBRE LA ESTRUCTURA CUATERNARIA DE LAS RNA POLIMERASAS

Es factible suponer que las reacciones de modificación con PLP afecten la compleja estructura cuaternaria de las RNA polimerasas, produciendo la disociación de algunas de las subunidades, como se ha propuesto en la modificación de la fosfofructoquinasa ovina por PLP (106). Esto explicaría la pérdida de actividad total y la incapacidad de la enzima para unir DNA, como se verá más adelante. Sin embargo, al preincubar la RNA polimerasa de E. coli (0,32 mg/ml) o la enzima I de levadura (0,6 mg/ml) con PLP 1 mM y luego reducir con NaBH₄ 6 mM (condiciones de inactivación total en ambos casos) no es posible detectar la pérdida de alguna subunidad de las enzimas, al analizar la estructura

nativa por electroforesis en geles de poliacrilamida.

En la figura 23 se muestran los trazados densitométricos de los geles que contienen la enzima de E. coli nativa y modificada y en la figura 24, los correspondientes a la enzima I de levaduras. No se advierte ninguna banda extra de proteína además de aquella correspondiente a la enzima nativa. No aparecen grandes diferencias en la movilidad relativa de las enzimas modificadas respecto a las nativas, aunque aparentemente ambas RNA polimerasas modificadas migran un poco más hacia el ánodo. Esto se puede explicar por la introducción de cargas negativas aportadas por el fosfato del PLP que alteran la carga total de la proteína. El efecto se puede amortiguar debido al elevado peso molecular de la enzima y no es tan notorio como se ha reportado para la modificación de la subunidad catalítica de aspartato transcarbamilasa por PLP (107,108).

G. EXISTENCIA DE DOS POBLACIONES DE GRUPOS AMINO EN RNA POLIMERASA

1. Efecto discriminatorio de la inactivación con PLP 0,1 mM sobre la RNA polimerasa de E. coli

Los estudios anteriores han establecido que la reacción de PLP con la RNA polimerasa de E. coli y también con la enzima I de levaduras, conduce a la modificación selectiva de residuos

DENSIDAD OPTICA RELATIVA A 650 nm

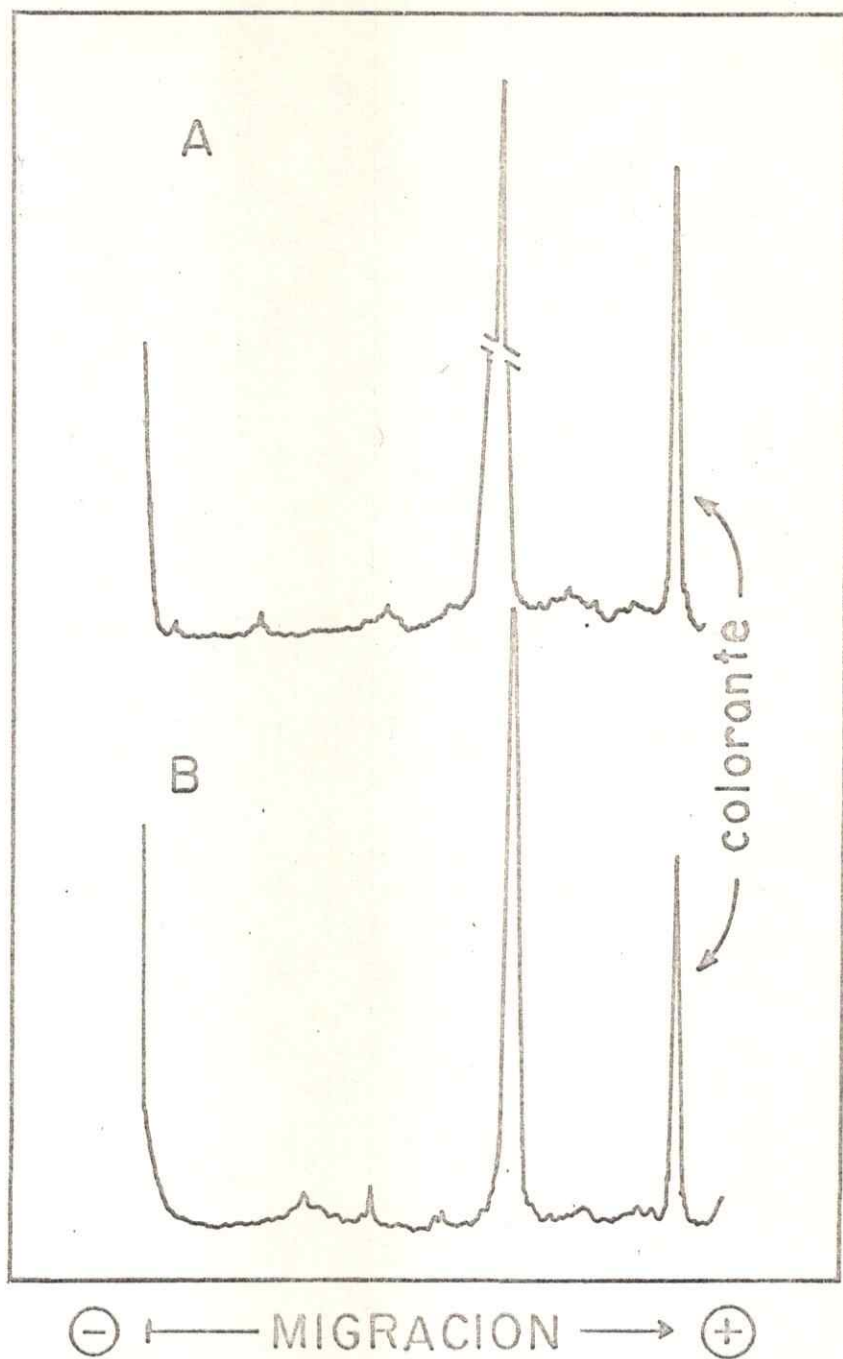


Figura 23. Efecto de la modificación con PLP sobre la estructura cuaternaria de la RNA polimerasa de *E. coli*.

La enzima (0,32 mg/ml) se incubó en BGMED, pH 8,0 por 12 minutos a 30° en ausencia (A) o en presencia (B) de PLP 1 mM y se redujo con NaBH_4 6 mM en frío. La electroforesis se realizó en tubos cilíndricos con acrilamida al 5%, con 15 μg de enzima por gel, como se indica en Métodos. El trazado densitométrico se realizó a 650 nm, a una velocidad de 25 mm/min.

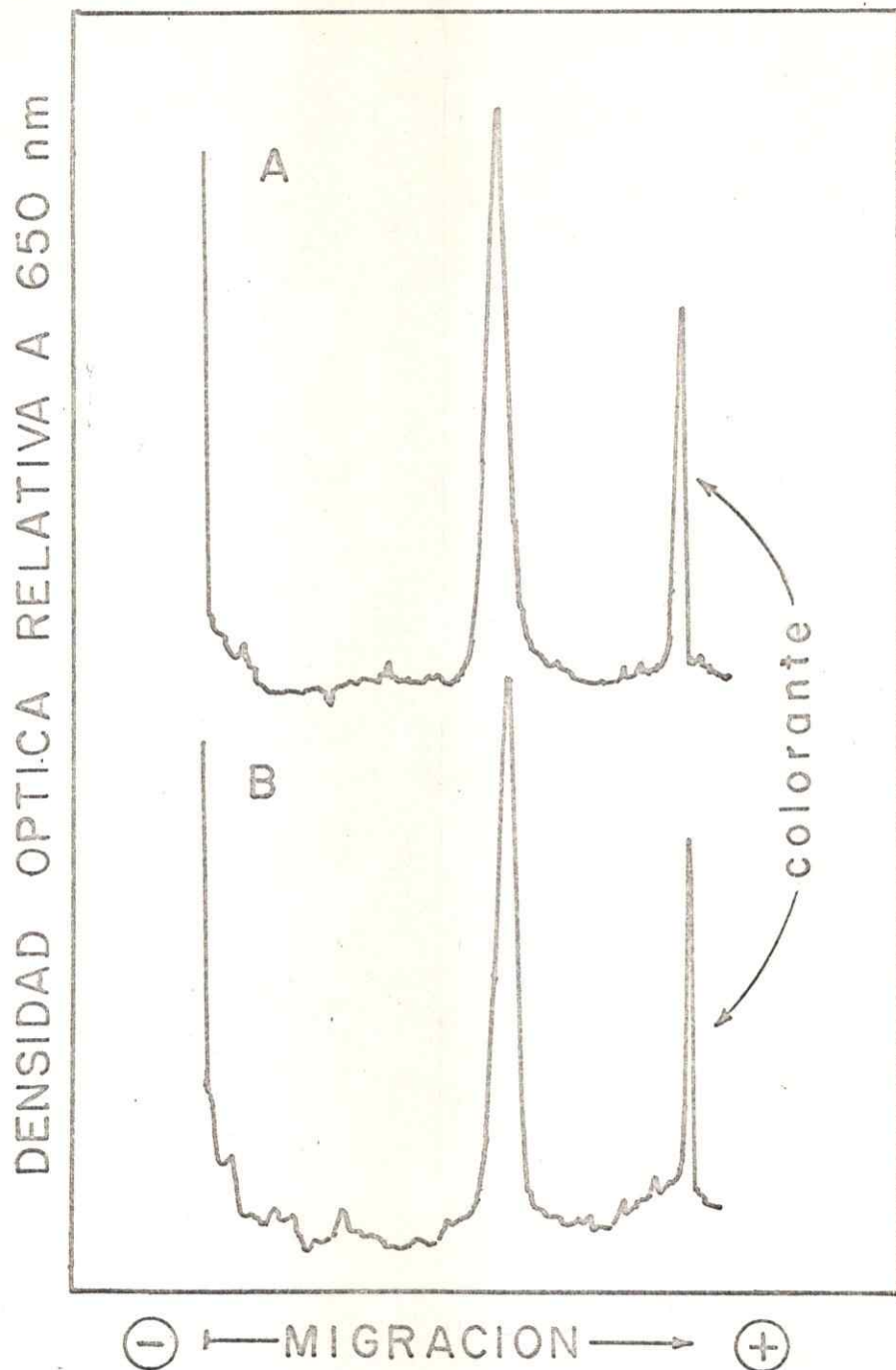


Figura 24. Efecto de la modificación con PLP sobre la estructura cuaternaria de la RNA polimerasa I de levaduras.

La enzima (0,6 mg/ml) se incubó como en la figura 23, en ausencia (A) o en presencia (B) de PLP 1 mM, se redujo con NaBH_4 6 mM. La electroforesis y el registro densitométrico se realizaron como en la figura 23.

de lisina. No ha sido posible detectar por electroforesis de alto voltaje o cromatografía en papel, otro residuo modificado por PLP. Es de interés conocer el rol que juegan estos residuos en la reacción de transcripción y establecer su número y si su población es homogénea frente a la reacción de modificación por PLP.

Al preincubar RNA polimerasa de E. coli (0,1 mg/ml) con PLP 0,1 mM en BGMED pH 8,0 se advierte un efecto notoriamente diferente al analizar la cinética de inactivación en relación a la síntesis de RNA y la capacidad de la enzima para unir DNA (primera etapa del proceso catalítico). En la figura 25 se muestra que mientras la actividad total (medida por la incorporación de UMP-³H en el RNA) cae rápidamente y luego de reducción con NaBH₄ 2 mM disminuye a un 18% con respecto al control; la capacidad de unir DNA-³H obtenido de células de hepatoma de rata (HTC) permanece inalterada aún después de reducción con NaBH₄ 2 mM. Esto sugiere que el bloqueo primario de la síntesis de RNA en estas condiciones debería estar en la iniciación o elongación del RNA producto. Sin embargo, en la figura 25 también se muestra que al analizar la cinética de inactivación con PLP 1 mM, es posible reducir además la capacidad de la enzima para unir DNA. Estos resultados sugieren la existencia de 2 poblaciones de grupos ε-amino de lisina. Una de ellas reacciona con concentraciones menores que 0,1 mM de PLP y afecta a una etapa posterior a la unión del DNA; la otra, reacciona rápidamente cuando

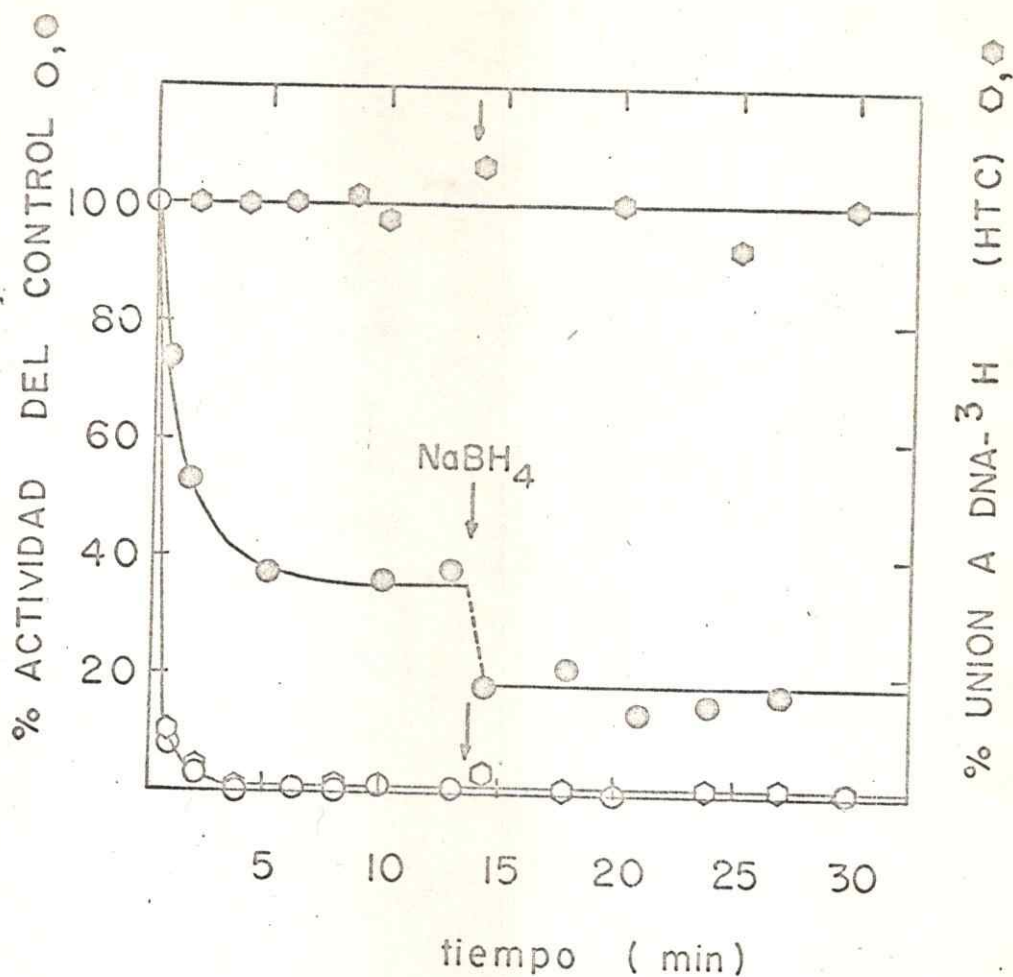


Figura 25. Efecto discriminatorio de la inactivación con PLP 0,1 mM sobre la RNA polimerasa de *E. coli*. Cinéticas de inactivación para ensayos de actividad enzimática y unión a DNA.

La enzima (0,11 mg/ml) se preincubó con PLP 0,1 mM (●, ●) y PLP 1 mM (○, ○) a 37°. Se realizó el ensayo de unión a DNA-³H de células HTC (●, ○) y de actividad enzimática (●, ○), según se describe en Métodos. La flecha indica el tiempo de adición de NaBH₄ 4 mM. El 100% de unión a DNA-³H correspondió a la retención en filtros de nitrocelulosa de 0,3 µg de DNA-³H de HTC y el 100% de actividad incorporó 0,72 nmoles de UMP-³H en el RNA usando enzima 0,018 mg/ml y DNA de timo de ternero como molde.

la concentración del modificador se eleva hasta 1 mM y produce una drástica disminución de la capacidad de la enzima para unirse a DNA. Este planteamiento concuerda con resultados anteriores obtenidos del análisis de la constante de inactivación por PLP a diferentes pH que indican la participación de 1 ó 2 grupos de pK_a 7,9 y también la modificación de otros grupos amino a pH más alcalinos que tendrían pK_a normales.

2. Número de residuos de lisina de cada población

En relación con la participación de residuos de lisina en el sitio activo de enzima de E. coli ha sido de interés establecer el número de grupos amino que constituyen estas dos poblaciones. Para estudiar directamente la interacción entre PLP y RNA polimerasa es ideal contar con el reactivo modificador marcado isotópicamente y debido a que no es posible obtenerlo comercialmente se ha elaborado un procedimiento basado en el método de Stock y col. (89), para sintetizar químicamente este producto, marcado isotópicamente en el hidrógeno de la función aldehído (ver Métodos). Se ha medido la incorporación de PLP-³H en la RNA polimerasa de E. coli, valorando al mismo tiempo el efecto que produce en la actividad total de la síntesis de RNA y en la capacidad de unión a DNA. La unión de PLP se ha medido directamente por incorporación de PLP-³H y retención de la enzima modificada en filtros de nitrocelulosa, como se describe en Métodos.

En la figura 26 se muestran curvas que representan la actividad enzimática total y la unión de la enzima a DNA-³H de HTC, en función de los moles de PLP-³H. Como todos los ensayos implican la medición de compuestos marcados con tritio, cada curva se ha determinado en base a experimentos gemelos; uno de ellos se utiliza para la medición de PLP-³H y el otro, realizado con PLP frío, se emplea ya sea para ensayo de síntesis de RNA o unión a DNA-³H. La figura 26 muestra que al extrapolar la pérdida de síntesis de RNA a 100% de inactivación, se detectan entre 1-2 moles de PLP-³H incorporados. Para la pérdida total de la capacidad de unión a DNA-³H de HTC se requiere la incorporación adicional de 24 moléculas de PLP-³H. En este gráfico también se observa que sólo después de modificar aproximadamente 5 residuos de lisina, empieza a disminuir la capacidad de unir DNA; de tal modo que sólo 21 residuos estarían relacionados con la unión a DNA de HTC. No todos parecen afectar en igual forma esta capacidad de la enzima. Se sugiere que aproximadamente 6 residuos afectan en forma más importante la unión a DNA.

Parte de estos resultados han sido confirmados por análisis espectrofotométrico midiendo la absorción de ϵ -amino fosfo piridoxil-lisina formada en la RNA polimerasa de E. coli, luego de modificación con diferentes concentraciones de PLP. Se midió en forma paralela la síntesis de RNA. Los resultados se muestran en la figura 27 y confirman que basta la modificación por PLP de 1-2 residuos de lisina en la enzima de E. coli para reducir casi totalmente la síntesis de RNA.

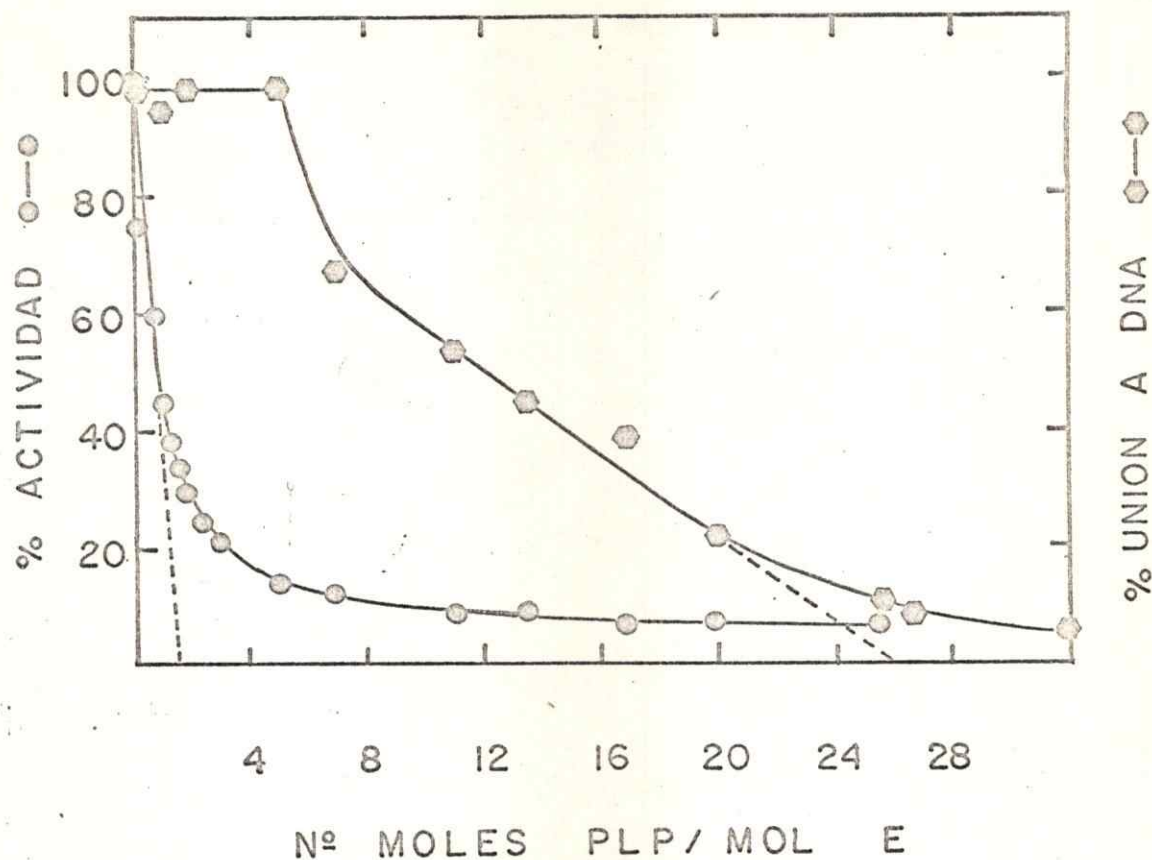


Figura 26. Determinación del número de moles de PLP-³H unidos a la RNA polimerasa de E. coli que anulan la actividad de síntesis de RNA y la unión a DNA.

Se analizó la actividad enzimática (●—●) y la unión a DNA (◻—◻) en función de la razón de moles de PLP-³H incorporados por mol de enzima a diferentes concentraciones del modificador. La RNA polimerasa de E. coli (0,2 mg/ml) se incubó con PLP-³H entre 0,0091 y 1,6 mM a 37°, pH 8,0, por 20 minutos, se redujo en frío con NaBH₄ 2 mM y se analizó la radiactividad incorporada según Métodos, bajo el título de ensayo de unión de PLP a RNA polimerasa, método radiactivo. Los ensayos de actividad enzimática y unión a DNA se realizaron según Métodos, con PLP no radiactivo en las mismas concentraciones. El 100% de actividad correspondió a la incorporación de 3,7 nmoles de UMP-³H en el RNA, por 6 µg de enzima, con DNA de bacteriófago T₄ como molde. El 100% de unión a DNA correspondió a una retención de 0,3 µg de DNA-³H de HTC (actividad específica de 54.000 cpm/µg).

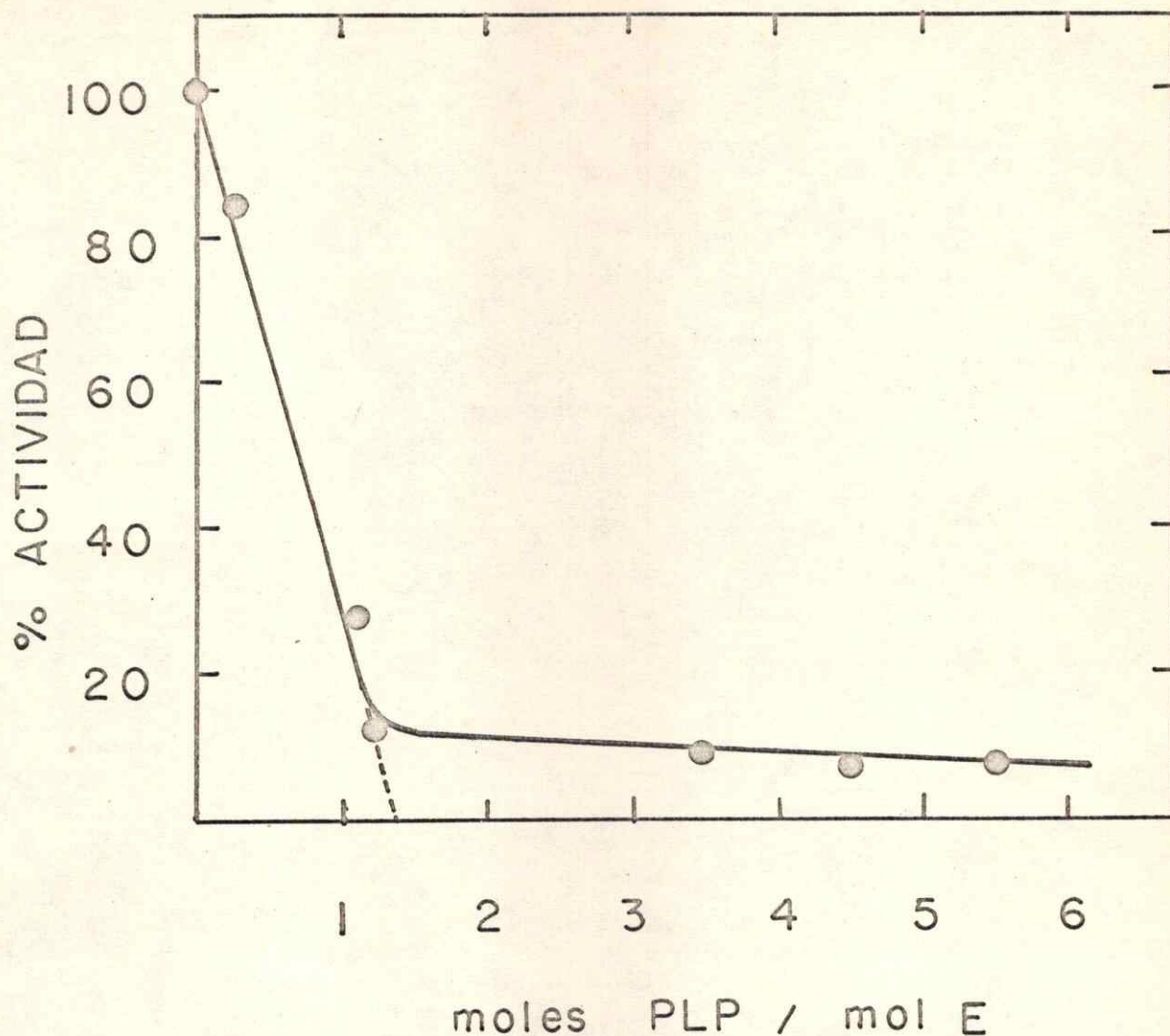


Figura 27. Determinación espectrofotométrica del número de moles de PLP incorporados en la RNA polimerasa de E. coli que la inactivan completamente.

Se analizó el % de actividad de síntesis de RNA en función de la razón de incorporación de moles de PLP por mol de enzima. La RNA polimerasa (0,3 mg/ml) se incubó con cantidades crecientes de PLP (0,005 a 0,5 mM) en barbital-HCl 20 mM, pH 8,0, por 30 minutos y 37° y se redujo con NaBH₄ en frío. Se ensayó actividad en alícuotas apropiadas y el resto se dializó como se indica en Métodos (ensayo de unión de PLP a RNA polimerasa, método espectrofotométrico), para medir el PLP incorporado por absorbancia a 325 nm. El 100% de actividad correspondió a la incorporación de 3,7 nmoles de UMP-³H por 6 µg de enzima, con DNA de bacteriófago T₄ como molde.

3. Moles de PLP incorporados en RNA polimerasa I de levaduras que la inactivan completamente

Para estudiar la incorporación de PLP en la RNA polimerasa I de levadura se utilizó $\text{NaB-}^3\text{H}_4$ en la reducción del complejo Enzima-PLP. La RNA polimerasa I de levaduras (0,8 mg/ml) se incubó con varias concentraciones de PLP en tampón barbital 20 mM pH 7,9 por 20 minutos a 30°C como se detalla en Métodos bajo el título de ensayo de la unión de PLP a RNA polimerasa, método radiactivo. Se redujo con $\text{NaB-}^3\text{H}_4$ 1 mM y se analizó la radiactividad retenida en filtros de nitrocelulosa. Paralelamente en muestras similares se determinó actividad enzimática. Los resultados presentados en la figura 28 muestran un gráfico lineal hasta un 30% de la actividad residual. En este punto una extrapolación a 100% de inactivación indica la incorporación de 3 moles de PLP por mol de enzima I, aunque se observa una desviación de esta línea que extrapolada a una completa inactivación indica 4-5 moles de PLP/mol de enzima. Estos resultados demuestran además que la reacción con RNA polimerasa I de levaduras es altamente selectiva.

H. EFECTO DE LA MODIFICACION POR PLP SOBRE ALGUNAS ETAPAS PARCIALES DE LA SINTESIS DE RNA

El proceso global de síntesis de RNA catalizado por la RNA polimerasa es complejo y puede desglosarse en varias etapas

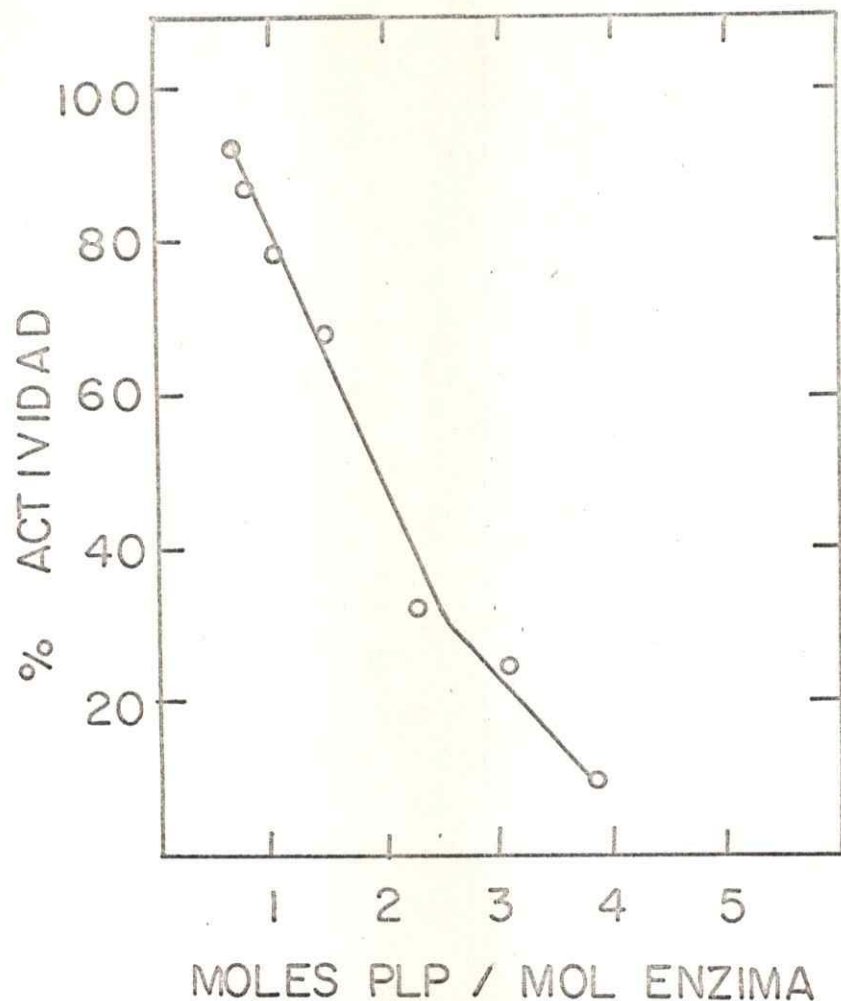


Figura 28. Determinación del número de moles de PLP incorporados en RNA polimerasa I de levaduras que la inactivan completamente.

Se analizó la actividad enzimática en función de la incorporación de PLP por mol de enzima. La enzima se incubó con varias concentraciones de PLP en barbital-HCl 20 mM, pH 7,9, por 20 minutos a 30°. Se redujo con NaB^3H_4 y se analizó la radiactividad como se indica en Métodos (ensayo de unión de PLP a RNA polimerasa, método radiactivo). Para ensayo de actividad se analizaron alícuotas similares, pero tratadas con NaBH_4 . El 100% de actividad enzimática correspondió a la incorporación de 1,5 nmoles de $\text{UMP-}^3\text{H}$ en el RNA, por 8 μg de polimerasa.

discretas: unión a DNA, iniciación, elongación y terminación de la cadena de RNA (5). Algunas de estas etapas, tales como la unión a DNA, iniciación y elongación, pueden estudiarse separadamente por métodos ya establecidos (70,71,109). Ha sido de interés estudiar algunas de estas etapas separadamente, con el objeto de analizar a qué nivel se produce la inactivación por PLP, en diferentes condiciones.

1. Unión a DNA

Los resultados de la figura 25 indicaron que al modificar la enzima de E. coli con PLP 1 mM, a 37°C, pH 8,0, se afectaba la capacidad de unión de la enzima a DNA-³H de HTC. Los experimentos descritos a continuación extienden este estudio, al analizar los efectos obtenidos, variando condiciones de temperatura, pH, concentración de PLP y analizando la unión de poli d(AT)-³H a la enzima de E. coli. Además se incluye el efecto de PLP sobre la RNA polimerasa I de levaduras.

- a) Formación del complejo DNA-enzima con RNA polimerasa modificada con distinta concentración de PLP y a diferente temperatura. Al estudiar la unión de poli d(AT)-³H a la RNA polimerasa de E. coli previamente tratada con PLP en condiciones que se obtiene un 85% de inactivación (tratamiento con PLP 0,1 mM más reducción con NaBH₄ 2 mM, a pH 8,0 y 37°C, da 15% de actividad residual con poli d(AT) como molde,

según se mostró en la figura 18) se observó que no se altera la capacidad de la enzima para unirse al polinucleótido, independientemente de la temperatura utilizada en la reacción de modificación. Los resultados que se presentan en la curva A de la figura 29 muestran una saturación hiperbólica para la enzima modificada que es indistinguible de la del experimento control. Sin embargo, si la reacción de modificación se realiza con PLP 1 mM más NaBH_4 2 mM (condiciones de total pérdida de actividad de síntesis de RNA), se produce una evidente disminución en la capacidad de retener poli d(AT)- ^3H en el filtro (curva B en la figura 29). Este resultado es también independiente de la temperatura utilizada en la reacción de modificación (0 ó 37°). Los resultados obtenidos en este mismo estudio pero utilizando DNA- ^3H de células de hepatoma de rata se muestran en la figura 30. Los datos indican nuevamente que luego de modificar la enzima de E. coli en condiciones que se obtiene un 85% de inactivación, (PLP 0,1 mM, NaBH_4 2 mM, pH 8,0 y 37° usando DNA de timo de ternera como molde según se muestra en la figura 18) no se modifica su capacidad para unirse a DNA. Este resultado no depende de la temperatura usada en la reacción de modificación (0 ó 37°). No obstante, si la modificación de la enzima se lleva a cabo con PLP 1 mM, reducción con NaBH_4 2 mM a pH 8,0 sólo a 37° se produce una notoria disminución de la capacidad de la enzima

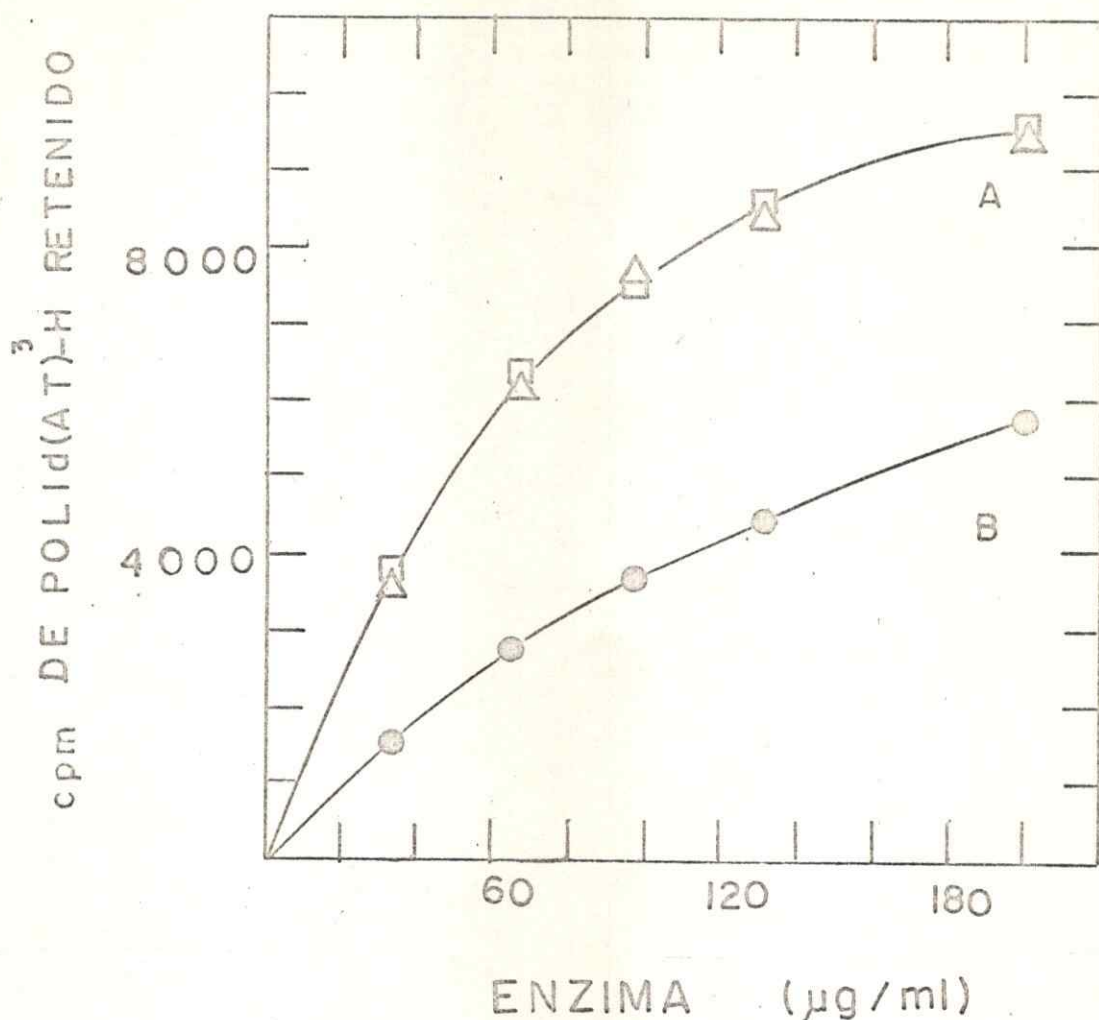


Figura 29. Unión a poli d(AT)-³H de la RNA polimerasa de E. coli modificada con PLP.

La enzima (0,65 mg/ml) se preincubó en BGMED pH 8,0, con PLP 0,1 ó 1 mM a 37° por 10 minutos y se redujo con NaBH₄ 2 mM. Se analizó en alícuotas adecuadas la unión a poli d(AT)-³H, con cantidades variables de enzima, como se indica en Métodos. El polinucleótido tenía una radioactividad específica de 25,1 µCi/µmol de P.

- : enzima no modificada, tratada con NaBH₄ 2 mM.
- △—△ : enzima modificada con PLP 0,1 mM.
- : enzima modificada con PLP 1 mM.

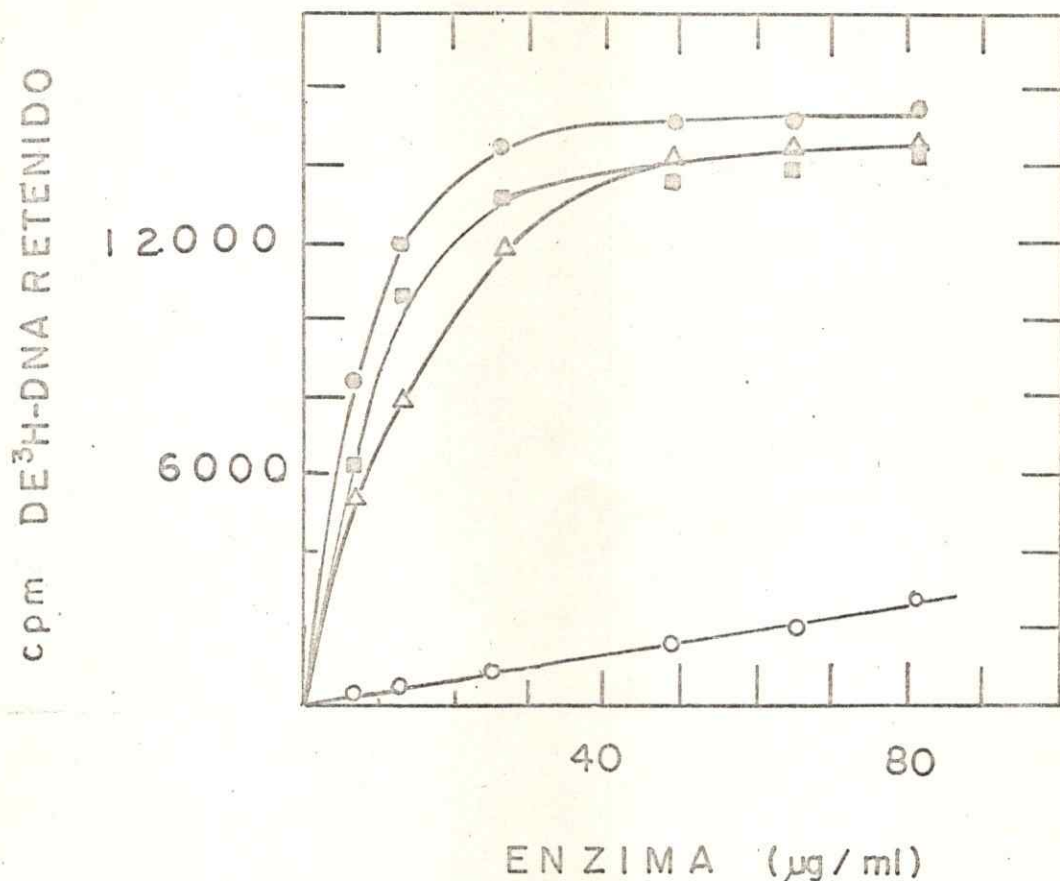


Figura 30. Unión a DNA-³H de HTC, de la RNA polimerasa de *E. coli* modificada con PLP.

La enzima (0,65 mg/ml) se modificó como en la figura 29. El ensayo de unión a DNA-³H de HTC (actividad específica 54000 cpm/µg) se realizó como se describe en Métodos.

- : enzima no modificada, tratada con NaBH₄ 2 mM.
- : enzima modificada con PLP 0,1 mM, a 0 ó 37°.
- △—△ : enzima modificada con PLP 1 mM, a 0°.
- : enzima modificada con PLP 1 mM, a 37°.

para retener DNA-³H en el filtro.

Resultados similares se obtuvieron usando DNA-³H de células de hepatoma de rata con la enzima I de levaduras en condiciones de modificación levemente diferentes: PLP 0,12 mM (actividad residual con DNA de timo, 21%) o PLP 1 mM (sin actividad) con NaBH₄ 2 mM en ambos casos, a pH 8,0 y 37°. La figura 31 muestra éstos resultados.

- b) Formación del complejo (DNA-enzima) con RNA polimerasa previamente modificada a pH 10.56. Todos los resultados anteriores se referían a modificación de la enzima a pH 8,0. Los resultados del efecto de pH en la constante de inactivación por PLP para la enzima de E. coli (ver figura 15) indican que la velocidad de inactivación de la RNA polimerasa por PLP 0,1 mM experimenta un brusco aumento sobre pH 10,0. Fue de interés entonces, estudiar la capacidad de unión a DNA-³H de la enzima de E. coli modificada en estas condiciones. Los resultados de este estudio se presentan en la figura 32. Los datos muestran que la RNA polimerasa modificada con PLP 0,1 mM, con NaBH₄ 2 mM, a 37° y a pH 10,56, presenta una capacidad notoriamente disminuída para unirse a DNA.

2. Iniciación de la síntesis de RNA

Los estudios previos han sugerido que la modificación con PLP más selectiva (a bajas concentraciones) afecta a las RNA polimerasas en una etapa posterior a la unión de la enzima al DNA.

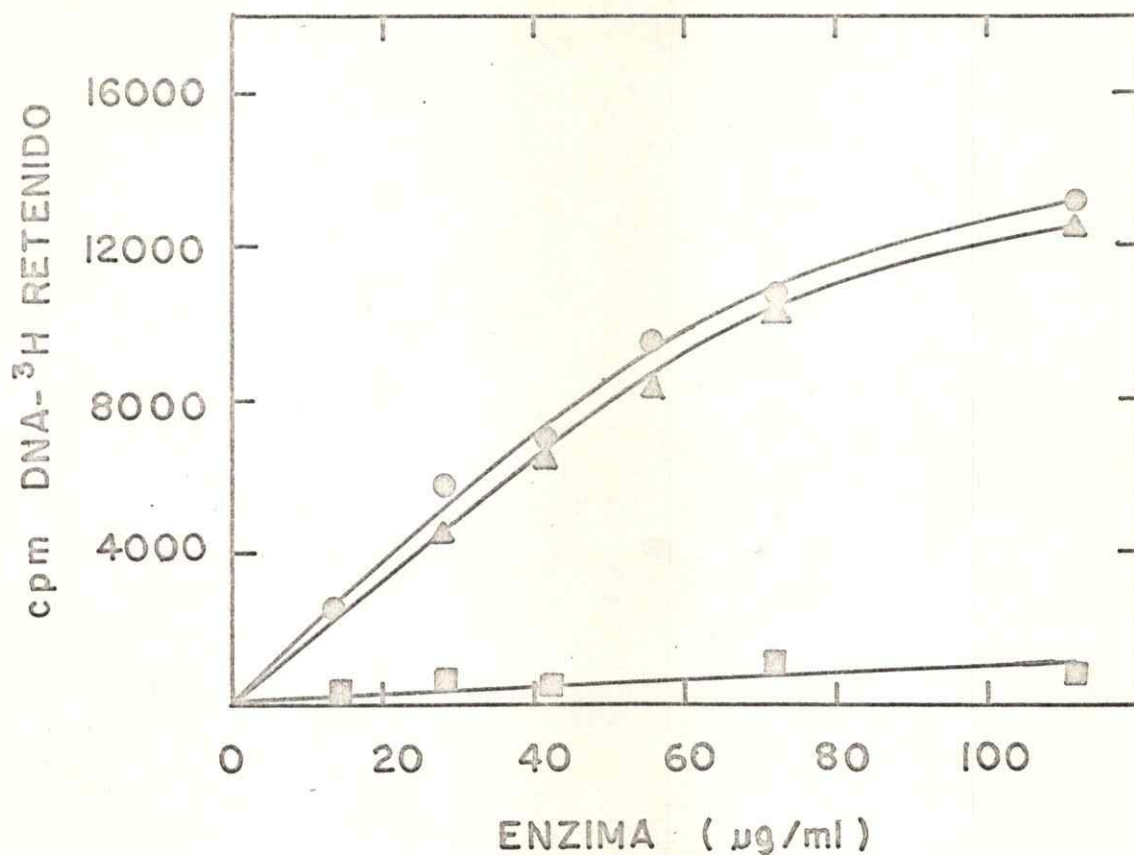


Figura 31. Unión a DNA-³H de HTC de la RNA polimerasa I de levaduras, modificada con PLP.

La enzima (0,7 mg/ml) se preincubó con PLP en BGMED, pH 7,9, a 37° por 10 minutos y se redujo con NaBH₄ 2 mM. Se analizó la unión a DNA-³H de HTC con cantidades variables de enzima, como se indica en Métodos.

- : enzima no modificada, tratada con NaBH₄
- ▲—▲ : enzima modificada con PLP 0,12 mM
- : enzima modificada con PLP 1 mM.

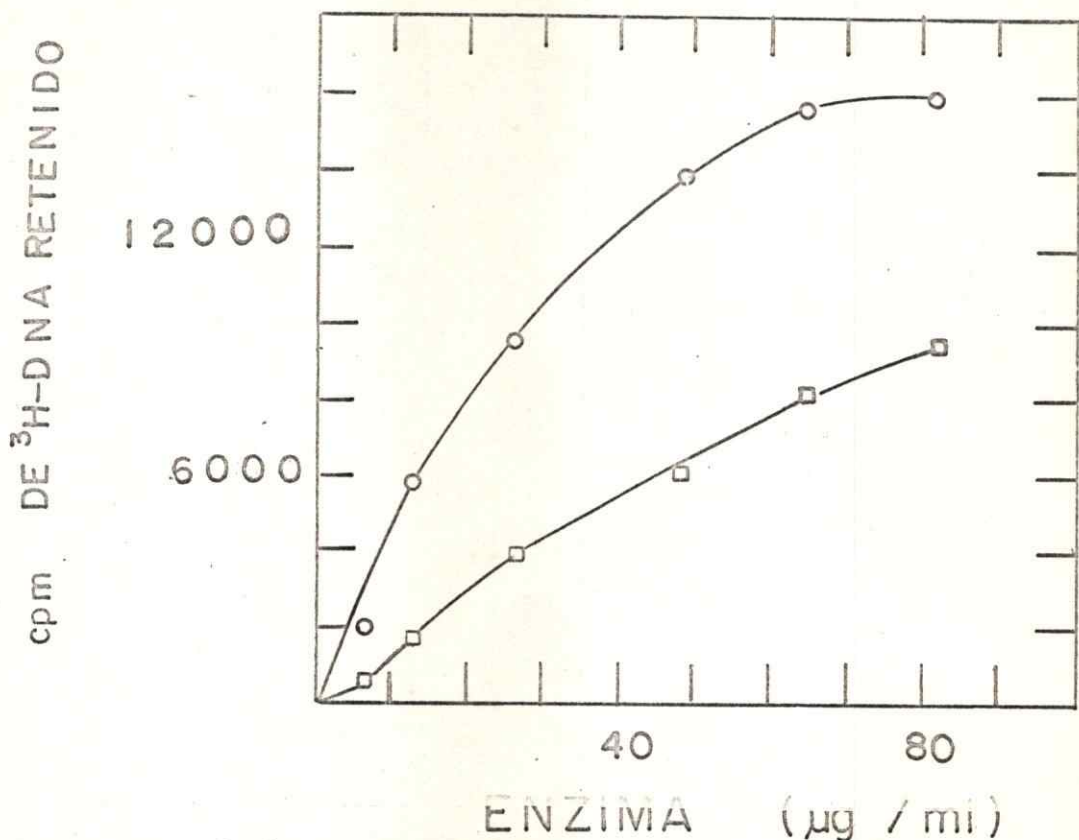


Figura 32. Unión a DNA-³H de HTC, de la RNA polimerasa de E. coli modificada con PLP a pH 10,56.

La enzima (0,65 mg/ml) se preincubó con PLP 0,1 mM, en BGMED pH 10,56, a 37° por 10 minutos y se redujo en frío con NaBH₄ 2 mM. 5 minutos después el pH se ajustó a 8,0 con Tris-HCl 0,1 M. El control (enzima no modificada) se trató en igual forma, pero se omitió PLP. El ensayo de unión a DNA-³H de HTC se realizó como se indica en Métodos.

○—○ : enzima no modificada, tratada con NaBH₄ 2 mM.

□—□ : enzima modificada a pH 10,56, con PLP 0,1 mM y NaBH₄ 2 mM, 37°.

Ha sido de interés explorar la reacción de iniciación de la síntesis de RNA ya que esta es la primera etapa donde ocurre un proceso químico (formación de enlace fosfodiéster) y es también la etapa donde se manifiesta la especificidad de la enzima. Otros autores (60,61) han sugerido la participación de grupos amino de RNA polimerasa en la etapa de iniciación. La iniciación de la síntesis de RNA puede medirse por la reacción de intercambio de $^{32}\text{PP}_i$ que es dependiente del DNA molde (71) o bien, por la incorporación de ATP- ^{32}P en el extremo 5' del RNA (110). El análisis presentado aquí se ha basado en el primer método. La reacción de intercambio de $^{32}\text{PP}_i$ con el segundo nucleótido incorporado luego de la formación del primer enlace fosfodiéster, se ha realizado siguiendo las indicaciones de Krakow y Fronk (71), con leves modificaciones como se comenta en Métodos. En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos con la enzima de E. coli y la enzima I de levaduras. Paralelamente, se indica en algunos casos, el % de actividad total de síntesis de RNA de ambas polimerasas usando DNA de timo de ternera como molde. Los datos indican que el sistema de ensayo de intercambio de ^{32}P PP_i es dependiente de poli d(AT), Mg^{2+} , UTP y enzimas, como se deduce de los valores obtenidos por omisión de ellos. En cambio, la ausencia de ATP no parece afectar en el ensayo. Este resultado ha sido descrito también por Krakow y Fronk (71) y se explica por una probable contaminación del UTP comercial con el ATP, y además, la concentración de ATP utilizada fue 100 veces más

Tabla 2. Iniciación de la síntesis de RNA. Reacción de intercambio de $^{32}\text{PP}_i$ dirigida por poli d(AT) y con ATP como sustrato iniciador.

Condiciones	cpm de $^{32}\text{PP}_i$ (iniciación)	% de actividad total (síntesis de RNA)
<u>RNA polimerasa E.coli</u>		
sistema completo	46.000	100
sin poli d(AT)	1.073	-
sin Mg^{2+}	1.267	-
sin UTP	728	-
sin ATP	15.900	-
enzima desnaturalada (5 min, 60°)	826	2,1
enzima-rifampicina (214 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	3.903	1,4
enzima-PLP (1 mM)	672	2,7
enzima-PLP (0,1 mM)	24.370	18
<u>RNA polimerasa I de levadura</u>		
sistema completo	7.676	100
sin poli d(AT)	345	-
sin enzima	85	-
enzima-PLP (0,18 mM)	1.646	21

La reacción de inactivación de las enzimas (1 mg/ml) con PLP en las concentraciones señaladas, se realizó en BGMED, pH 8,0, por incubación durante 15 minutos a 37°. Luego se agregó NaBH_4 2 mM en frío. En forma similar se procesaron los controles respectivos, omitiendo PLP. La enzima de E. coli se inactivó con rifampicina 214 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en BGMED, pH 8,0 por 10 minutos a 37°. Posteriormente se realizó el ensayo de intercambio de $^{32}\text{PP}_i$ como se describe en Métodos, bajo el título ensayo de iniciación de la síntesis de RNA. La radiactividad total de $^{32}\text{PP}_i$ (actividad específica 2.953 Ci/mol) agregada al sistema en un volumen de 0,1 ml fue de 124.300 cpm en el ensayo con la enzima de E. coli y 251.000 cpm para la RNA polimerasa I de levaduras. El ensayo de actividad enzimática residual se realizó en ambos casos a 37°, con DNA de timo de ternera como molde, según se describe en Métodos.

baja que la de UTP.

Para la polimerasa de E. coli, la modificación con PLP 0,1 mM produce una reducción aproximadamente del 50% en la reacción de intercambio y para la enzima I de levaduras, la modificación con PLP 0,18 mM reduce el intercambio aún más drásticamente (22%). Se advierte además, para la enzima de E. coli, una reducción casi total del intercambio cuando se preincuba la enzima (1 mg/ml) con rifampicina 214 µg/ml, un típico inhibidor de la iniciación de la síntesis de RNA (111). Con estos datos se sugiere que la modificación con PLP más selectiva de las RNA polimerasas (población de 1-2 grupos amino en la polimerasa de E. coli y probablemente la modificación de hasta 3 residuos de lisina en la enzima I de levaduras) se relaciona con el proceso de iniciación medido por la reacción de intercambio de $^{32}\text{PP}_i$.

Sin embargo, existe la posibilidad que la medición de intercambio de $^{32}\text{PP}_i$ antes descrita no represente realmente iniciación. Aunque se utiliza baja concentración de uno de los sustratos ($\text{ATP} = 10^{-6} \text{ M}$) lo cual restringe la etapa de polimerización del RNA (112), es posible que este ensayo incluya intercambio correspondiente a la etapa de polimerización. Krakow y Fronk (71) han demostrado además que otros nucleótidos aparte de ATP, pueden funcionar como iniciadores en la medición por intercambio de PP_i . El uso de ADP como nucleótido iniciador, aunque menos eficiente, limita el intercambio de $^{32}\text{PP}_i$ sólo al

primer enlace fosfodiéster ya que ADP no puede utilizarse en el proceso de elongación. Con esto, los resultados experimentales son exclusivamente representativos de un intercambio debido a iniciación de la síntesis de RNA. En la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos con la polimerasa de E. coli, usando ADP 10^{-6} M. Los datos indican resultados similares a los obtenidos en la tabla 2. La modificación con PLP 0,1 mM reduce a un 10% la capacidad de la enzima para catalizar el intercambio de $^{32}\text{PP}_i$. Con la enzima I de levaduras no fue posible cuantificar la iniciación de la síntesis de RNA con este método, ya que los niveles de intercambio de $^{32}\text{PP}_i$, usando ADP, fueron muy bajos.

I. ESTUDIOS DE PROTECCION DE LA MODIFICACION POR PLP

1. Protección medida por ensayo de actividad total

Los experimentos se realizaron siempre utilizando la modificación por PLP más selectiva para las enzimas de E. coli y I de levaduras.

- a) Protección y recuperación de la actividad por DNA. Al estudiar el efecto protector de DNA de bacteriófago T_4 sobre la reacción de inactivación de la enzima de E. coli con PLP 0,1 mM, se encontró que no sólo protege parcialmente a la enzima sino que también es capaz de revertir la reacción cuando se agrega al complejo enzima-PLP que no ha sido

Tabla 3. Iniciación de la síntesis de RNA. Reacción de intercambio de $^{32}\text{PP}_i$, catalizada por la RNA polimerasa de E. coli, dirigida por poli d(AT) y con ADP como sustrato iniciador.

Condiciones	cpm de $^{32}\text{PP}_i$ (iniciación)	% de actividad total (síntesis de RNA)
Sistema completo	11.035	100
Sin poli d(AT)	1.177	-
Sin UTP	944	-
Sin ADP	2.447	-
Sin enzima	198	-
+ enzima-rifampicina (1,71 $\mu\text{g/ml}$)	1.602	14
+ enzima-rifampicina (214 $\mu\text{g/ml}$)	1.226	1,6
+ enzima-PLP (0,1 mM)	2.290	20,9
+ enzima-PLP (1,0 mM)	505	3,11

La radiactividad total agregada al sistema en un volumen final de 0,1 ml fue de 235.300 cpm de $^{32}\text{PP}_i$ (actividad específica 2.953 Ci/mol). La concentración final de ADP fue 1×10^{-6} M y los resultados son un promedio del experimento en triplicado. Otras condiciones de ensayos son iguales a las descritas en la tabla 2.

reducido con NaBH_4 . En la figura 33 se muestra que DNA de bacteriófago T_4 0,14 mg/ml agregado previamente a la enzima de E. coli (0,18 mg/ml) o después de alcanzar el máximo de inhibición con PLP 0,1 mM a pH 8,0 y 30°, protege o se recupera la actividad en un 57% del máximo de inhibición alcanzado (67%). Los resultados son muy similares al estudiar el efecto protector de DNA de timo de ternera en la enzima de E. coli (figura 34) y en la enzima I de levaduras (ver tabla 5). La inhibición de un 65% producida por PLP 0,1 mM en la polimerasa de E. coli (figura 34), comienza a revertirse por la adición de DNA de timo de ternera (0,17 mg/ml) al tiempo señalado por la flecha A, protegiendo en un 55%. Si se agrega DNA después de la reducción con NaBH_4 2 mM como se indica en la flecha B de la figura no hay recuperación de la actividad enzimática. Esto se debe a que el PLP está unido covalentemente a la enzima. En esta figura se incluye a modo de comparación, el efecto de Tris-HCl 0,4 mM en la recuperación de la enzima inhibida por PLP. No se advierte ninguna recuperación de la actividad enzimática aunque en la figura 8, el efecto de Tris-HCl 17 mM fue muy notorio. El efecto protector del DNA no se debe a un efecto de reversión por los grupos amino del DNA que en todo caso estarían comprometidos en la estructura secundaria de esta macromolécula (doble hebra), ni tampoco protege a la enzima por consumo del PLP presente, ya que se demostró antes que PLP no reacciona con DNA (figura 20).

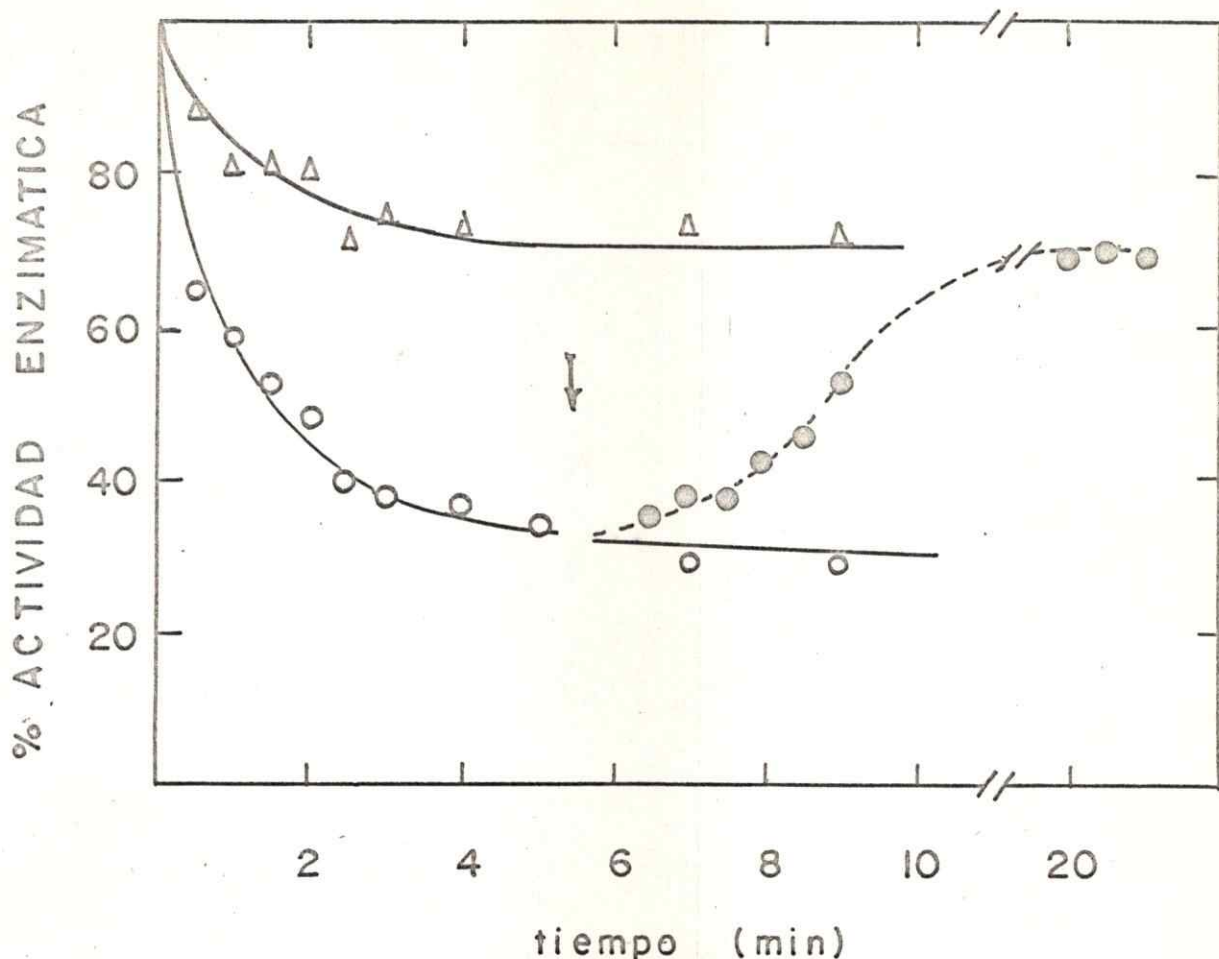


Figura 33. Efecto del DNA de bacteriófago T_4 en la cinética de inactivación de la RNA polimerasa de *E. coli* con PLP.

La enzima (0,18 mg/ml) se inactivó con BGME pH 8,0 a 30°, con PLP 0,1 mM en ausencia (○—○) o en presencia (Δ—Δ) de DNA de bacteriófago T_4 0,14 mg/ml. A los 5,5 minutos (flecha), una alícuota de la muestra preincubada en ausencia de DNA, se trató con DNA de bacteriófago T_4 0,14 mg/ml (●—●). La actividad enzimática se ensayó a 30°, con 0,09 mg/ml de enzima y el mismo DNA como molde, según se indica en Métodos.

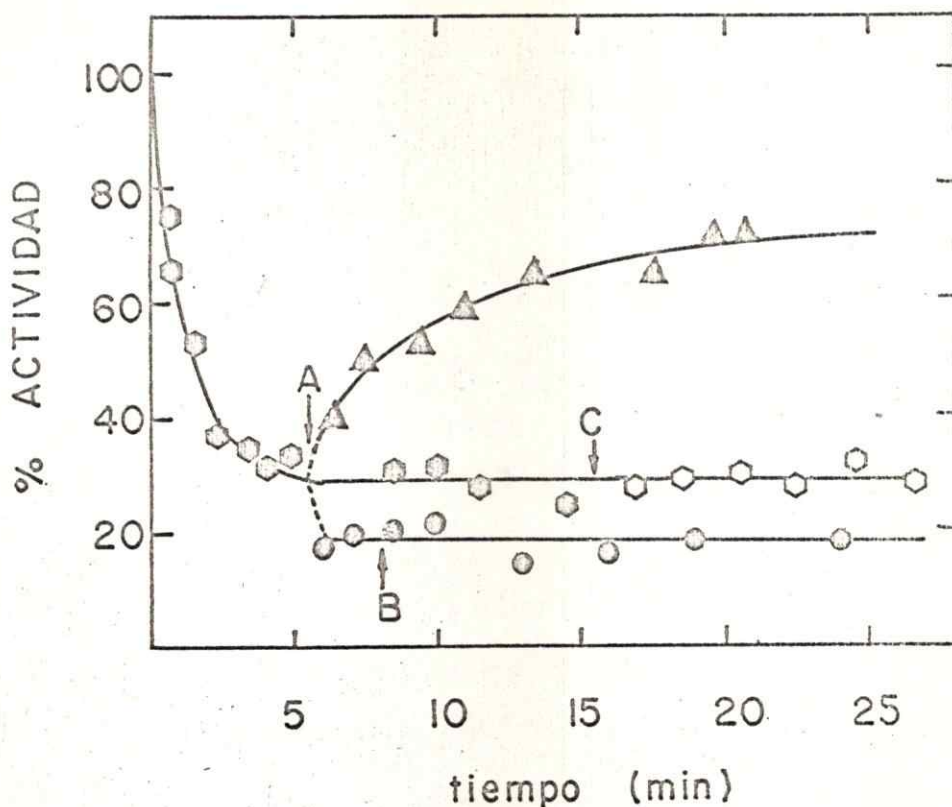


Figura 34. Efecto del DNA de timo de ternero en la cinética de inactivación de la RNA polimerasa de *E. coli* con PLP.

La enzima (0,11 mg/ml) se inactivó en BGME pH 8,0, a 37°, con PLP 0,1 mM. Al tiempo indicado por la flecha A se separan 3 alícuotas que se tratan con DNA de timo de ternero 0,17 mg/ml (▲—▲), NaBH₄ 2 mM (●—●) y la alícuota restante se trata con Tris-HCl 0,4 mM, pH 8,0, al tiempo indicado por la flecha C (○—○). La flecha B indica la adición de DNA de timo de ternero 0,17 mg/ml a la alícuota previamente tratada con NaBH₄ 2 mM. El ensayo de actividad se realizó a 37° con enzima 0,018 mg/ml y DNA de timo de ternero como molde, según se indica en Métodos.

En todo caso se puede calcular la concentración de grupos amino de una solución de DNA de fago T₄ de 0,14 mg/ml en base a su composición de bases (113) y a su peso molecular (85) obteniéndose un valor de 0,28 mM en grupos amino. Lo mismo puede calcularse para una solución de DNA de timo de ternera 0,17 mg/ml, según su composición de bases (114) y peso molecular (115) dando un valor de 0,4 mM en grupos amino. En la figura 34 se demostró que una concentración de Tris-HCl 0,4 mM no produce ninguna reversión en la inactivación por PLP 0,1 mM de la enzima de E. coli. Por lo tanto, el efecto protector del DNA es específico y producido probablemente por un impedimento estérico que limita la accesibilidad del PLP o facilita su desplazamiento de la enzima por la estrecha vecindad entre el sitio de unión del DNA y el sitio de iniciación. Los resultados anteriores sugieren que el PLP se une a la enzima probablemente en el sitio de iniciación y puede ser desplazado por la unión del DNA. Como estos grupos amino no están relacionados con la unión de la enzima a DNA, es posible pensar que el efecto protector del DNA es un evento secundario que ocurre luego de su unión a la enzima.

- b) Protección por nucleótidos. Se consideró de interés estudiar el efecto de sustratos y la adición simultánea de DNA sobre la reacción de inactivación. Con este objeto se incubó RNA polimerasa de E. coli (0,18 mg/ml) con PLP 0,1 mM en

presencia de distintas concentraciones de UTP, ATP, y ATP + DNA de fago T₄; a tiempos apropiados se sacaron alícuotas de 0,03 ml para la determinación de actividad enzimática. Todos los experimentos se realizaron a pH 8,0 en las condiciones detalladas en Métodos bajo el título de experimentos cinéticos. Los resultados se muestran en la tabla 4. En ella se compara el % de actividad a tiempo infinito (A_{∞}) que es el porcentaje de actividad residual luego de terminada la reacción de inactivación, y la constante de velocidad de inactivación de experimentos realizados con diferentes concentraciones de nucleótidos y/o DNA. Los datos de esta tabla indican que nucleótidos como CTP y ATP no tienen efecto sobre la reacción de inactivación hasta una concentración de 0,1 mM. A concentraciones de 0,5 mM y 1 mM se observa un pequeño efecto protector del orden de 7 a 10%; en cuanto al DNA de fago T₄ la protección es de 57% como se ha indicado anteriormente y aumenta en un 10% más cuando ATP está también presente en la preincubación. Esto sugiere que los efectos protectores de ATP y DNA son probablemente independientes y por lo tanto, aditivos. Esta explicación es consistente con el hecho que en presencia de DNA y ATP se ha formado un complejo de preiniciación y por lo tanto, el sitio de iniciación debe estar más protegido.

Resultados semejantes se obtuvieron con la enzima I de

Tabla 4. Efecto de nucleótidos y DNA en la cinética de inactivación de la RNA polimerasa de E. coli con PLP.

	% actividad (A _∞)	% protección (A _∞)	k _{obs} ⁻¹ (min ⁻¹)
Sin PLP (control)	100	-	-
PLP 0,1 mM	30	-	0,53
PLP 0,1 mM + CTP 0,01 mM	30	0	0,53
PLP 0,1 mM + CTP 0,05 mM	30	0	0,53
PLP 0,1 mM + CTP 0,1 mM	30	0	0,50
PLP 0,1 mM + CTP 0,5 mM	35	7	0,57
PLP 0,1 mM + CTP 1,0 mM	37	10	0,60
PLP 0,1 mM + ATP 0,5 mM	35	7	0,63
PLP 0,1 mM + ATP 1,0 mM	37	10	0,65
PLP 0,1 mM + DNA de bacteriófago T ₄ (0,14 mg/ml)	70	57	0,70
PLP 0,1 mM + DNA de bacteriófago T ₄ (0,14 mg/ml) desnaturalado	68	54	0,72
PLP 0,1 mM + DNA de bacteriófago T ₄ (0,14 mg/ml) y ATP 1,0 mM	76	66	-
PLP 0,1 mM + DNA de bacteriófago T ₄ (0,28 mg/ml) y ATP 1,0 mM	77	67	-

La enzima (0,18 mg/ml) se incubó por 30 segundos con los nucleótidos y/o DNA en BGMED pH 8,0 a 30° y luego se incubó por 15 minutos con PLP. Otros detalles se describen en Métodos, experimentos cinéticos, párrafo 3. El ensayo de actividad con una concentración de enzima de 0,09 mg/ml se realizó como se describe en Métodos. El 100% de actividad correspondió a la incorporación de 2,4 nmoles de UMP-³H en el RNA. El DNA se desnaturaló por calentamiento a 100° durante 5 minutos y enfriamiento rápido en mezcla hielo-metanol.

levaduras (tabla 5), aunque los nucleótidos protegieron un poco más (20-30%) y el efecto obtenido con DNA, ATP, GTP y CTP presentes, produjo una protección de 90%, indicando también aditividad.

2. Protección medida frente a la incorporación de PLP-³H en la RNA polimerasa de E. coli

a) Protección por DNA y nucleótidos. Los resultados antes comentados sugirieron los estudios de protección por poli d(AT) y por sustratos frente a la reacción de incorporación de PLP-³H en ensayos de actividad total. En la figura 35 se muestra un efecto protector con diferentes concentraciones de poli d(AT), ATP y UTP cuando se preincuba la enzima (0,52 mg/ml) con estos compuestos por 14 minutos y luego se ensaya para incorporación de 2 nmoles de PLP-³H como se indica en Métodos. Estimando el peso molecular de poli d(AT) en 50.000, según lo indica el fabricante, es posible estimar que una concentración de 0,12 μ M, protege efectivamente un 40% frente a la reacción de modificación medida por incorporación de 2 moles de PLP-³H.

El efecto protector de ATP y UTP es similar (entre 62-70% de protección) y difieren sólo si se les comparan a concentraciones de alrededor de 1 mM. En este rango, ATP parece ser un protector mucho más efectivo que UTP, lo que sugiere que la protección se realiza para un grupo amino

Tabla 5. Efecto de nucleótidos y DNA en la cinética de inactivación de la RNA polimerasa I de levaduras con PLP

	% de actividad residual	% de protección
sin PLP (control)	100	-
PLP 0,2 mM	50	-
PLP 0,2 mM + ATP 1,0 mM	65	30
+ GTP 1,0 mM	65	30
+ CTP 1,0 mM	60	20
+ ATP, CTP y GTP		
1 mM en total	90	80
PLP 0,2 mM + DNA de timo de ternera (0,16 mg/ml)	80	60
PLP 0,2 mM + DNA de timo de ternera (0,16 mg/ml) y ATP, CTP y GTP 1 mM		
en total	95	90

La enzima (0,4 mg/ml) se preincubó 5 min en BGMED pH 7,9 con los nucleótidos y/o DNA a 30°C y luego se incubó por 10 minutos con PLP. Otros detalles se señalan en Métodos bajo el título experimentos cinéticos, párrafo 3. Se realizó el ensayo de actividad de alícuotas que contienen 4 mg de enzima como se indica en Métodos. El 100% de actividad correspondió a la incorporación de 0,75 nmoles de UMP-³H en el RNA.

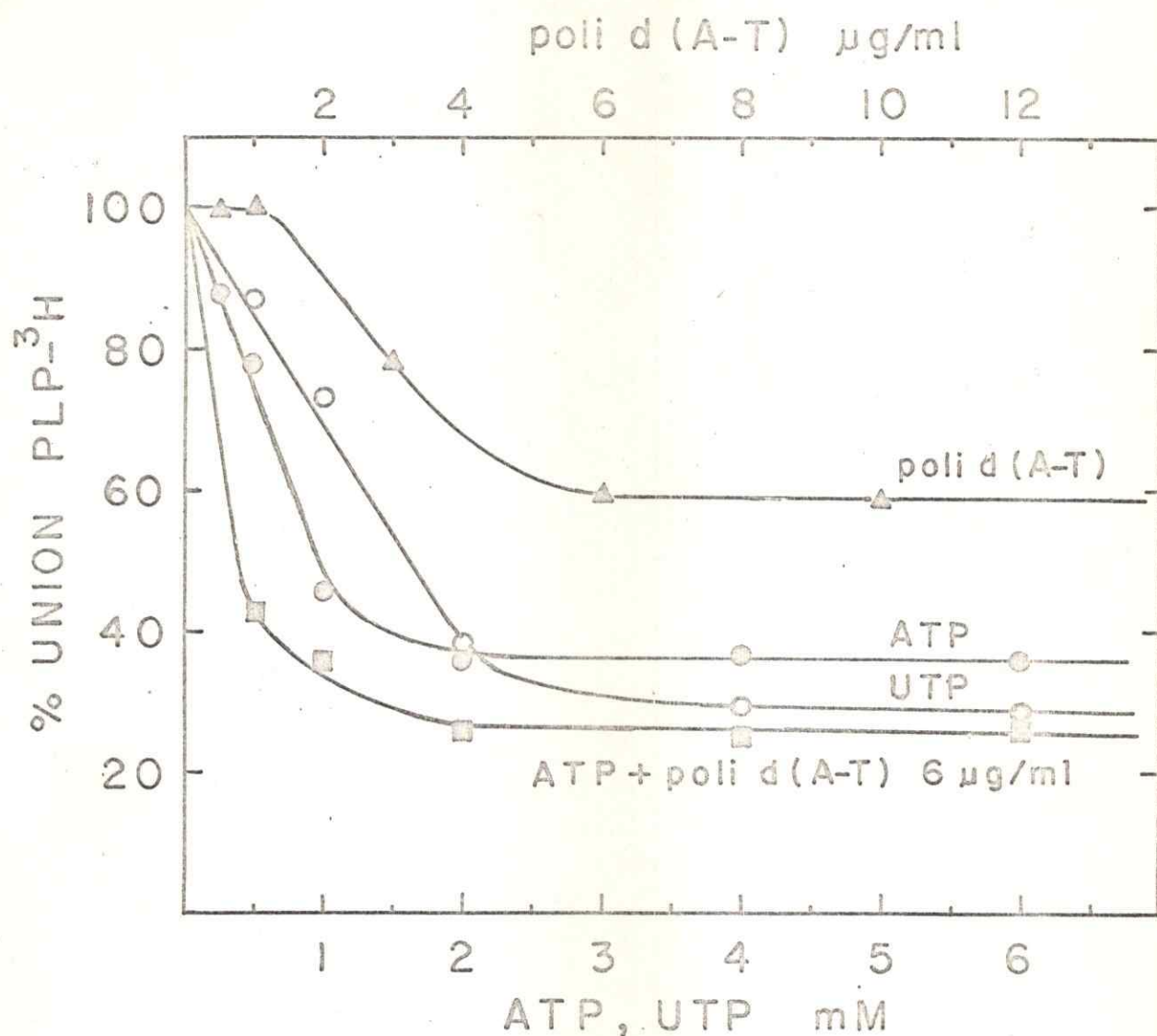


Figura 35. Efecto protector de poli d(AT), ATP y UTP en el ensayo de unión de PLP-³H a la RNA polimerasa de *E. coli*.

La enzima (0,52 mg/ml) se preincubó a 37°, durante 14 minutos con concentraciones crecientes de poli d(AT) ($\Delta-\Delta$), ATP ($\bullet-\bullet$) UTP ($\circ-\circ$) ó ATP en presencia de una concentración fija de poli d(AT) ($\square-\square$). Luego se agregó PLP-³H, 0,06 mM final (actividad específica 26 Ci/mol), y se incubó 20 minutos más a 37°. Se redujo con NaBH₄ en frío. El ensayo de unión de PLP-³H se realizó como se indica en Métodos. El 100% de unión correspondió a la incorporación de 0,21 nmoles de PLP-³H en la enzima.

implicando en la iniciación, si se considera que en general se han propuesto como nucleótidos iniciadores a ATP y GTP (116-118).

Un mayor efecto protector por ATP, se advierte cuando la preincubación se realiza en presencia de una cantidad fija de poli d(AT) (6 $\mu\text{g/ml}$), aunque este efecto no es completamente aditivo. Estos resultados indican que el sitio protegido en la enzima de E. coli (1-2 grupos ϵ -amino) es en cierto grado compartido por poli d(AT) y ATP para la unión simultánea de ellos al formar el complejo de preincubación.

- b) Efecto de rifampicina y AF/013. Ha sido de interés explorar si rifampicina, un antibiótico descrito como un inhibidor de la iniciación para las enzimas bacterianas (119) bloquea estos grupos amino para que reaccionen con PLP. En la figura 36 se muestra el efecto de rifampicina y AF/013 (compuesto sintético derivado de rifampicina) en la incorporación de PLP- ^3H . La enzima se preincuba a 0 $^\circ\text{C}$ con concentraciones entre 42,8 y 428 $\mu\text{g/ml}$ de estos antibióticos y luego se mide la incorporación de PLP- ^3H . De esta figura se advierte que rifampicina no interfiere con la incorporación de PLP- ^3H , a pesar que con la concentración más baja usada, la enzima está completamente inhibida. Esto indica que ambos compuestos se unen independientemente a la enzima y sin embargo, afectan la misma etapa catalítica.

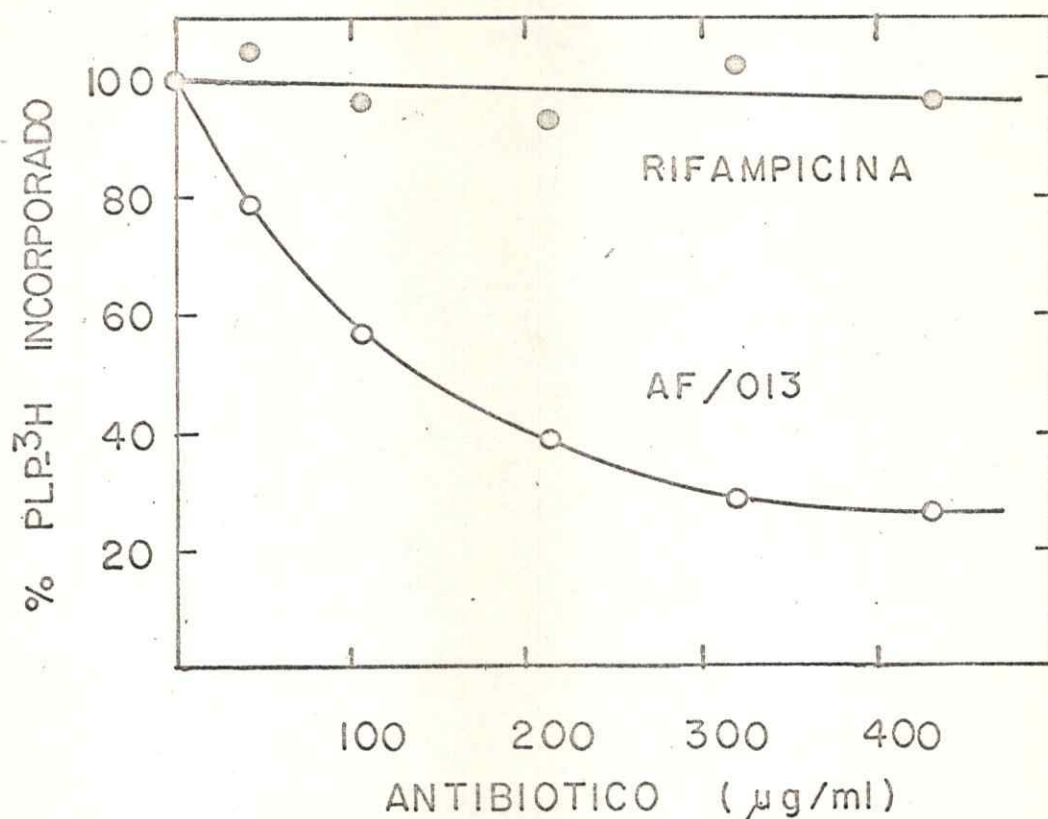


Figura 36. Efecto de Rifampicina y AF013 en la unión de PLP-³H a la RNA polimerasa de *E. coli*.

La RNA polimerasa (0.6 mg/ml) se preincubó a 0°C con concentraciones entre 42,8 y 428 µg/ml de cada antibiótico disuelto en DMSO. Luego se agregó PLP-³H 0,1 mM y se incubó 20 minutos a 37°C. Se redujo con NaBH₄ 2 mM en frío. La unión de PLP-³H se ensayó como se describe en Métodos. El 100% de unión correspondió a la retención de 0,35 nmoles de PLP-³H.

AF/013 posee un efecto diferente y en la figura 36 se observa que no permite la incorporación posterior de PLP- ^3H . Esto se explica en base al diferente mecanismo de inhibición propuesto para este derivado. El AF/013 inhibe por formación de una envoltura hidrofóbica alrededor de la enzima, con varias moléculas de este compuesto, sin existir un mecanismo de inhibición específico. Esta pantalla restringe el acceso de PLP a la enzima pero no es por competencia de un mismo sitio de unión.

J. MARCACION DE LAS SUBUNIDADES DE LAS ENZIMAS CON PLP

1. RNA polimerasa de E. coli

Con el objeto de caracterizar la ubicación en la enzima del o de los sitios de reacción del PLP, se incubó la RNA polimerasa (0,2 mg/ml) con PLP 0,1 mM en tampón BGMED a pH 8,0 y 300, durante 20 minutos, en presencia o ausencia de DNA de timo de ternera. El complejo formado con PLP se redujo a 02 con $\text{NaB-}^3\text{H}_4$ 1,8 mM (250 Ci/mol) y se dejó reaccionar por 5 minutos, se incubó a 500 5 minutos más para destruir el $\text{NaB-}^3\text{H}_4$ remanente. Se agregaron 50 μg de poli A para facilitar la precipitación con TCA al 20%, se lavó el precipitado 2 veces con una mezcla etanol-éter (1:1). El precipitado se disolvió en el tampón de electroforesis para geles de poliacrilamida al 9% con 0,1% de SDS y se procedió según Laemmli (98) usando un sistema en placa. Se

aplicaron muestras con 7 μg de proteínas y la radiactividad se midió por fluorografía (ver Métodos). En la figura 37 se muestran los trazados densitométricos de los autoradiogramas obtenidos. El registro A muestra la marcación de las subunidades β, β' y α . No se encuentra radiactividad asociada con la subunidad δ . El registro B muestra el efecto protector del DNA de timo de ternera, el cual reduce notoriamente la marca, sin mostrar un efecto preferencial en la protección de alguna subunidad. Con el fin de aclarar si la marcación de las subunidades β, β' y α ocurre debido a que las condiciones de modificación de la enzima no son los más selectivos, se procedió a analizar el perfil de marcación de las subunidades al modificar la enzima bacteriana (0,4 mg/ml) con PLP 0,05 y 1,0 mM. Se usó PLP- ^3H (26 Ci/mol), se incubó en las mismas condiciones ya descritas, reduciendo con NaBH_4 2 mM. Luego de diálisis exhaustiva con tampón barbital-HCl 20 mM, pH 8,0, MgCl_2 10 mM, EDTA 1 mM y 2-mercaptoetanol 10 mM, alícuotas con 80 μg de proteínas se sometieron a electroforesis en geles de acrilamida al 12% con SDS al 0,1%. Los geles cilíndricos se cortaron en segmentos de 2 mm y se incubaron en tubos de conteo con 0,5 ml de una mezcla de solubilizador NCS/ H_2O (relación de volúmenes 9:1) a 54 $^\circ\text{C}$ durante 3 horas. La radiactividad se determinó agregando 8 ml de líquido de centelleo TENAP. En la figura 38 A se observa que el perfil de marcación de las subunidades usando PLP- ^3H 0,05 mM o 1 mM (figura 38, densitogramas A y B respectivamente) es similar, en el aspecto cualitativo, al presentado en la figura 37 (densitograma A) de modo que se confirma la modificación de las subunidades

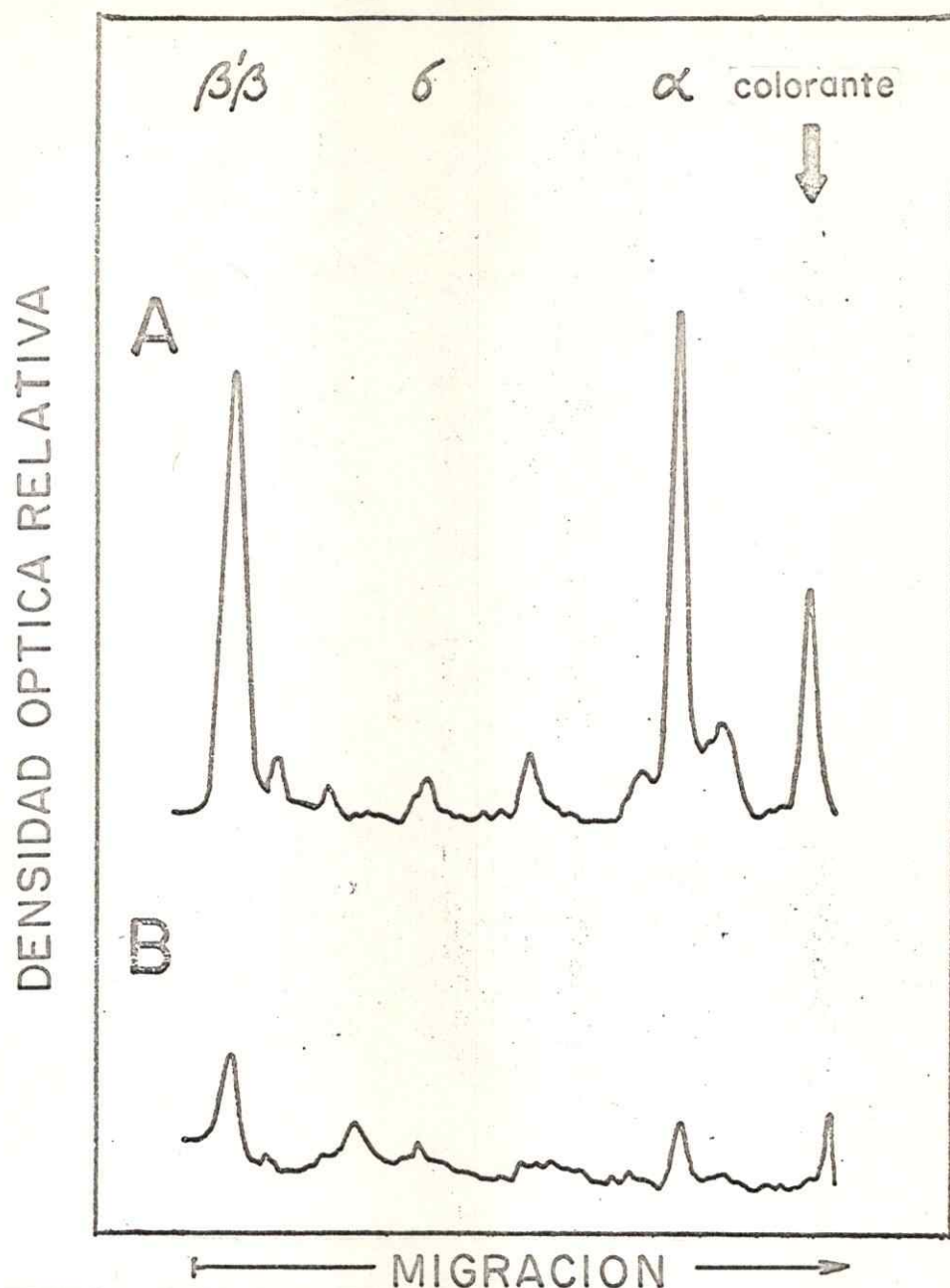


Figura 37. Marcación de subunidades de la RNA polimerasa de *E. coli* con PLP 0,1 mM y $\text{NaB-}^3\text{H}_4$.

La enzima (0,2 mg/ml) se incubó en BGMED pH 8,0 con PLP 0,1 mM en ausencia (A) o en presencia (B) de DNA de timo de ternero 0,3 mg/ml durante 20 minutos a 30°. Se redujo a 0° con $\text{NaB-}^3\text{H}_4$ 1,8 mM (250 Ci/mol). Las muestras (7 µg) se concentraron por precipitación con TCA y las subunidades se separaron por electroforesis en placa de gel de poliacrilamida al 9%, con SDS 0,1%. La radiactividad de los geles (revelada por fluorografía) y los trazados densitométricos se realizaron como se indica en Métodos. Se incluye la posición de las subunidades detectadas por tinción con Azul de Coomassie en una muestra corrida simultáneamente.

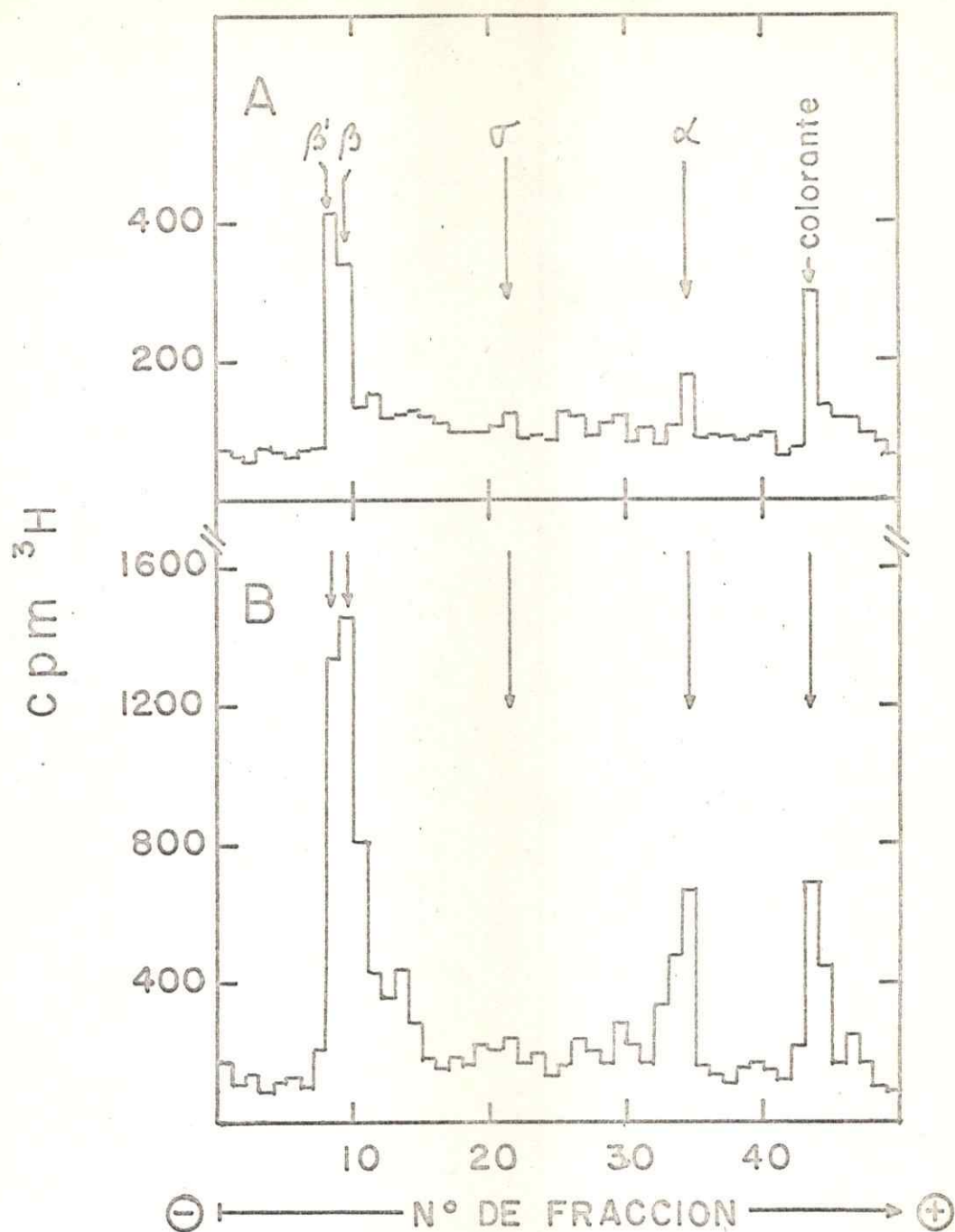


Figura 38. Marcación de las subunidades de la RNA polimerasa de *E. coli* con PLP- ^3H .

La enzima (0,4 mg/ml) se inactivó con PLP- ^3H en las mismas condiciones de la figura 37 y se redujo con NaBH_4 2 mM. Luego de diálisis se aplicaron 80 μg de proteína a geles cilíndricos de poliacrilamida al 12% con SDS 0,1% y la electroforesis se realizó según Métodos. Segmentos de 2 mm de los geles se solubilizaron en NCS y la radiactividad se analizó en líquido de centelleo TENAP.

A: enzima modificada con PLP- ^3H 0,05 mM.

B: enzima modificada con PLP- ^3H 1 mM.

β , β' y α . Se advierte además, en estos resultados, que al modificar la enzima con $\text{NaB-}^3\text{H}_4$ y PLP 0,1 mM se incorpora más radiactividad en la subunidad α que en $\beta + \beta'$, con respecto a la incorporación obtenida con PLP- ^3H 0,05 mM. Esta diferencia podría deberse a que la incorporación de PLP, en el sentido cuantitativo, sería dependiente de la concentración del modificador: con PLP 0,05 mM se marcaría preferentemente $\beta + \beta'$, con PLP 0,1 mM la incorporación sería mayor en α y con PLP 1 mM nuevamente se marcaría más $\beta + \beta'$ que α . En todo caso, no se intentan comparaciones de orden cuantitativo en la marcación de las subunidades.

2. RNA polimerasa I de levaduras

Para estudiar la marcación de las subunidades de la RNA polimerasa I de levaduras se realizó un análisis similar al inicialmente descrito para la enzima de E. coli. La enzima (0,375 mg/ml) se incubó con PLP 0,16 mM en las mismas condiciones antes comentadas durante 30 minutos. Se redujo con $\text{NaB-}^3\text{H}_4$ 1,8 mM (250 Ci/mol) y se procesó en idéntica forma. Se sometió a electroforesis en placa de gel de acrilamida al 11% con SDS 0,1% como se indica en Métodos. La radiactividad de las subunidades se determinó por fluorografía y simultáneamente se corrió una muestra de enzima no modificada que se usó para determinar la posición de las subunidades de la enzima. En la figura 39, densitograma A, se muestra la migración de las 11 subunidades de

DENSIDAD OPTICA RELATIVA

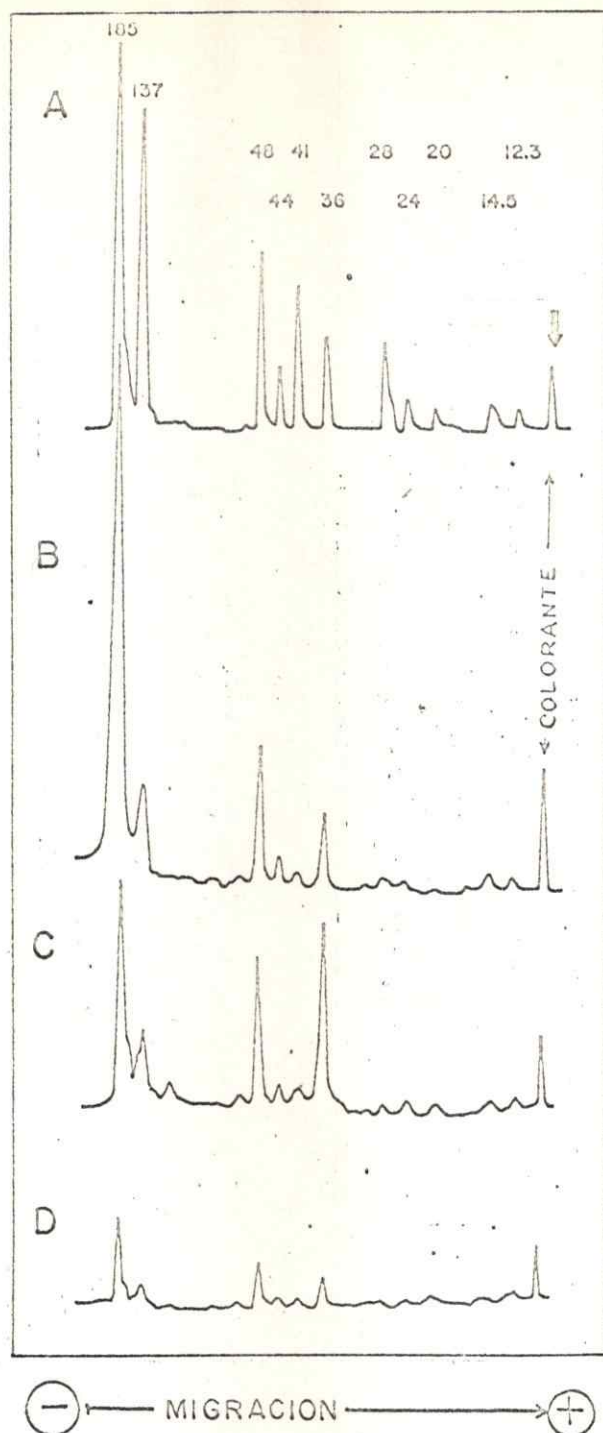


Figura 39. Marcación de las subunidades de la RNA polimerasa I de levaduras con PLP y $\text{NaB-}^3\text{H}_4$.

La enzima (0,375 mg/ml) se incubó con PLP 0,16 mM, en BGMED pH 7,9, por 30 minutos, en ausencia o presencia de DNA y nucleótidos, y se procesó en idéntica forma como se describe en la figura 37. La electroforesis se realizó en placa de gel de poliacrilamida al 11% con SDS 0.1%, según Métodos. Se incluyó otra muestra para determinar la posición de las subunidades por tinción. La radiactividad incorporada se detectó por fluorografía.

- A: subunidades de la enzima teñida con Azul de Coomassie.
- B: subunidades marcadas con PLP 0,16 mM.
- C: protección de ATP, GTP y CTP (1 mM c/u).
- D: protección por DNA 0,3 mg/ml.

la polimerasa I de levaduras, cuyos pesos moleculares son: 185.000, 137.000, 48.000, 44.000, 41.000, 36.000, 28.000, 24.000, 20.000, 14.000 y 12.000. El densitograma B muestra que en las condiciones descritas se marcan fuertemente las subunidades de peso molecular 185.000, 48.000 y 37.000. El densitograma C de esta misma figura muestra un efecto protector específico producido por ATP, GTP y CTP 1 mM cada uno, sobre la modificación por PLP de la subunidad de P.M. 185.000. Finalmente en el densitograma D, se presenta el efecto protector del DNA de timo de ternera (0,3 mg/ml) que reduce simultáneamente la marcación de las 3 subunidades modificadas por PLP. Estos resultados, junto con los experimentos de intercambio de $[^{32}\text{P}]$ - PP_i indican que el sitio catalítico responsable de la iniciación reside en la subunidad de peso molecular 185.000.

DISCUSION

La síntesis de RNA catalizada por la RNA polimerasa de E. coli involucra la unión previa de DNA y sustratos nucleotídicos a la enzima; estos compuestos poseen grupos fosfato y recientemente se ha sugerido la participación de grupos amino en enzimas que requieren nucleótidos o coenzimas nucleotídicas (120). El piridoxal 5'-fosfato ha sido usado para estudiar el sitio de unión de sustratos forforilados en algunas enzimas (65-68). En varias de ellas, la reacción específica entre PLP y algunos aminoácidos ha hecho que este compuesto sea una herramienta muy útil para identificar grupos amino que participan en la catálisis (96,121, 122).

En este trabajo se ha demostrado que PLP inhibe rápida y selectivamente a la RNA polimerasa de E. coli y también a RNA polimerasas de algunos eucariontes. Su uso ha permitido obtener información acerca del sitio activo de estas enzimas.

A. EVIDENCIAS CINÉTICAS PRELIMINARES DE LA REACCION ENTRE RNA POLIMERASA DE E. COLI Y PLP.

Los estudios cinéticos de inactivación de la enzima en presencia de exceso de PLP sobre la enzima indican que la reacción procede con una cinética de primer orden. A pH 8,0, con PLP 0,1 mM, se obtiene una constante de velocidad de $0,53 \text{ min}^{-1}$. Al

aumentar progresivamente la concentración de PLP se advierte un efecto de saturación en el valor de la constante de velocidad. Estos datos sugieren la formación reversible de un complejo no covalente entre enzima y PLP previo a la formación de una base de Schiff. Esto indica que existe un sitio físico saturable en la enzima donde se une y actúa el PLP. Esta situación se ha encontrado a menudo al estudiar la cinética de inactivación de enzimas por reactivos dirigidos al sitio activo, por ejemplo, la inhibición de carboxipeptidasa por bromoacetil-N-metil-fenilalanina (123) y glutamato deshidrogenasa por PLP (122).

El pH afecta la velocidad de inactivación, y los resultados indican que la reacción es dependiente de un grupo ionizable de pK_a 7,9 y además experimenta un brusco aumento sobre pH 10,0. El grupo de pK_a 7,9 podría ser un grupo ionizable de PLP o un residuo de la enzima. PLP posee tres grupos ionizables; el fosfato ioniza con pK_a 2,12 y 6,2, el grupo hidroxilo tiene un pK_a 4,14 y el nitrógeno aromático, 8,69 (124). Dado que el pK_a del nitrógeno aromático del PLP es relativamente cercano al valor encontrado para la reacción de inactivación, los resultados cinéticos no permiten descartar su participación en la reacción. Sin embargo, por razones discutidas más adelante, esta posibilidad no es factible. El nitrógeno se encuentra lejos del centro de reacción y su desprotonación produciría una disminución, en lugar de un aumento en la velocidad de reacción, dado que disminuiría la electrofilicidad del grupo carbonilo, afectando de este modo en forma

negativa al ataque de la amina sobre este grupo (125).

Lo más probable es que el pK_a de 7,9 corresponda a la ionización de un grupo amino de la enzima que reacciona con PLP, pudiendo ser un grupo α -amino, o un ϵ -amino de la cadena lateral de una lisina. Las reacciones de formación de bases de Schiff son fuertemente dependientes de la nucleofilicidad de la amina y por lo tanto requieren que ésta este desprotonada (125). Si se tratara de un grupo ϵ -amino de una lisina, hecho que ha sido demostrado para una serie de enzimas que se inactivan con PLP, implicaría que el microambiente que rodea al grupo amino es de baja polaridad o que se encuentra cerca de otros grupos cargados positivamente (126). Ambas posibilidades están de acuerdo con los resultados cinéticos encontrados y con posibles hipótesis acerca del rol que este grupo amino juega en la actividad de la enzima. Una carga positiva cercana al grupo amino que reacciona con PLP explicaría la mayor eficiencia que éste tiene sobre piridoxal por una interacción iónica de ella con el grupo fosfato. De igual modo, una menor polaridad del sitio de reacción favorece esta interacción iónica presumiblemente importante para la unión de nucleótidos o de DNA.

El brusco aumento de la velocidad de inactivación sobre pH 10 podría explicarse como debido a la desprotonación de otros grupos amino, los que, como se discute más adelante, pueden estar también involucrados en la actividad de la enzima, con valores de pK_a más altos.

La fuerza iónica del medio tiene un marcado efecto sobre la velocidad de inactivación por PLP, la que disminuye extensiblemente al aumentar la fuerza iónica entre 0,05 y 1,0, como muestra la figura 16. Esto se puede interpretar como resultado de una perturbación a una interacción electroestática entre ambos reaccionantes. Siguiendo en la línea de pensamiento esbozada anteriormente, ésta sería la interacción entre el grupo fosfato del PLP y un grupo catiónico de la enzima.

B. FORMACION DE BASE DE SCHIFF EN LA REACCION DE INACTIVACION

Los resultados obtenidos han demostrado la formación de base de Schiff para la RNA polimerasa de E. coli, y la RNA polimerasa I de levaduras, mediante varios criterios. En el caso de las enzimas de hígado de rata, la formación de base de Schiff deducida del análisis espectral típico descrito para esta reacción (resultados no presentados), es discutible. Esto se debe a que las enzimas utilizadas no son homogéneas, tarea que ha sido en general muy difícil para diversas investigaciones que han usado esta fuente de enzimas. Sin embargo, los efectos de aminas y NaBH_4 en la inactivación de las enzimas de hígado de rata (figura 9) sugieren que PLP reacciona con ellas mediante la formación de base de Schiff.

Por otro lado para la enzima de E. coli se ha recurrido a la medición espectrofotométrica directa de la velocidad de

formación de la base de Schiff y se ha calculado una constante de velocidad de $0,99 \text{ min}^{-1}$ a pH 8,6 (ver figura 19). Este valor es muy semejante al obtenido para la velocidad de inactivación de la enzima por PLP en iguales condiciones, lo que está de acuerdo con el mecanismo de inactivación propuesto, es decir, a través de la formación de una base de Schiff entre un grupo amino de la enzima y el grupo carbonilo del PLP.

C. ANALISIS ESTRUCTURAL DE LAS ENZIMAS MODIFICADAS. IDENTIFICACION DE N- ξ -PIRIDOXIL-LISINA

Se ha identificado a N- ξ -piridoxil-lisina como el aminoácido modificado luego del tratamiento de la RNA polimerasa de E. coli y de la enzima I de levaduras con PLP 0,1 y 0,2 mM respectivamente, a pH 8,0, 37° y NaBH_4 2 mM. La otra posibilidad de reacción de PLP con grupos amino primarios corresponde a los residuos amino terminales de las cadenas polipeptídicas de la RNA polimerasa (grupos α amino). Por estudios parciales de secuencia de aminoácidos del extremo amino terminal de todas las subunidades de RNA polimerasa de E. coli, cepa K-12, se demuestra que el aminoácido amino terminal corresponde en todos los casos a metionina (127). Sin embargo, por análisis de electroforesis de alto voltaje del hidrolizado total de la enzima, no se ha detectado el derivado N- α -piridoxil metionina. Más aún, al modificar la enzima de E. coli en las mismas condiciones

con PLP 1 mM, sólo se ha detectado N- ϵ -piridoxil-lisina como aminoácido modificado.

D. DOS CLASES DE RESIDUOS ϵ -AMINO DE LISINA EN RNA POLIMERASAS

Los resultados experimentales descritos indican la existencia de 2 poblaciones de grupos ϵ -amino de lisina en la RNA polimerasa de E. coli y probablemente en la enzima I de levadura. Algunos de estos grupos amino se relacionan con el sitio activo de las enzimas y difieren en su reacción frente a PLP y su efecto sobre ciertas etapas parciales de la síntesis de RNA.

Los resultados obtenidos con la enzima de E. coli sugieren que una de estas poblaciones es capaz de reaccionar con concentraciones de PLP menores que 0,1 mM y su modificación afecta a 1-2 residuos de lisina implicados, como se discutirá más adelante, en una etapa posterior a la unión del DNA. La otra población reacciona al elevar la concentración del modificador hasta 1 mM produciéndose una drástica pérdida de la capacidad de la enzima para unirse al DNA. En este caso, se modifican 24 residuos de lisina.

Para RNA polimerasa I de levadura se ha detectado que la población más reactiva estaría formada por aproximadamente 3 residuos de ϵ -amino de lisina y el número de residuos de lisina implicados en la unión de esta enzima al DNA no ha sido

establecido, sin embargo, se estableció que es necesario modificar varios residuos más, para abolir la capacidad de esta enzima para unirse a DNA.

Las propiedades reactivas de estas poblaciones de grupos amino estarían dadas fundamentalmente por el microambiente que las rodea y además por la accesibilidad para el modificador. Esto se refleja en los valores de pK_a obtenidos en la enzima de E. coli. La población más reactiva posee 1-2 grupos amino con pK_a 7,9; la otra población de grupos amino tienen posiblemente pK_a de alrededor de 10,5. Ambos valores fueron obtenidos en base a estudios de la constante de inhibición por PLP, en función de pH. Todo esto concuerda con la proposición de Jencks que sugiere para la formación de una base de Schiff, el ataque de un nucleófilo fuerte y por lo tanto, un grupo amino desprotonado debería reaccionar preferentemente sobre el protonado (125).

La inactivación total de la enzima por incorporación de 1-2 moles de PLP-³H está de acuerdo con resultados cinéticos que indican la participación de 1-2 grupos amino de pK_a 7,9 en esta reacción.

En relación a la población compuesta de 24 residuos de lisina de la enzima de E. coli, se supone que sólo algunos de ellos son importantes en la interacción de la enzima con el DNA. Aunque este número de residuos modificados parece elevado y podría indicar poca selectividad en la modificación, es importante recordar que la heloenzima de E. coli posee un total de 252

lisinas (127), por lo que la modificación correspondería sólo a un 10%. Sólo después de modificar 5 residuos de lisina de la enzima bacteriana, empieza a disminuir la capacidad de la enzima para unirse al DNA y aparentemente, de los residuos restantes, sólo algunos de ellos afectan en forma más importante la unión al DNA. Resultados similares han sido propuestos por Krakow (resultados no publicados) al modificar RNA polimerasa de Azotobacter vinelandii con trinitrobenzeno sulfonato (TNBS), e indica la modificación de 39 residuos en la enzima nativa y 10 de ellos son protegidos por poli d(AT) frente a la reacción con TNBS. Este autor sugiere que estos grupos estarían involucrados en la unión del molde. La participación de residuos de ϵ -amino de lisina en la interacción DNA-RNA polimerasa indica que existe un importante aporte de naturaleza iónica en esta reacción.

Se ha demostrado también (figura 23 y 24) que la reacción de modificación con PLP hasta 1 mM, no afecta la estructura cuaternaria de las polimerasas, de modo que los efectos en la actividad enzimática se deben sólo a la modificación de residuos de lisina.

E. ROL DE GRUPOS AMINO EN LA CATALISIS. ESTUDIO DE LAS REACCIONES PARCIALES

1. Unión a DNA

Los resultados de los estudios de la unión de las enzimas de E. coli y levadura a DNA, indican que las condiciones de modificación son muy importantes en cuanto a producir o no una alteración en la capacidad de la enzima para unirse a DNA. Al modificar la enzima de E. coli con PLP 0,1 mM, NaBH₄ 2 mM, pH 8,0 a 37° ó 0° se produce una enzima aproximadamente 85% inactiva en la síntesis de RNA y la capacidad para unirse a DNA permanece inalterada. Esto indica que el o los grupos amino modificado en estas condiciones no cumplen una función en cuanto a la unión a DNA, aunque deben estar relacionados o cerca del sitio de unión a DNA, pues también se ha demostrado que éste es capaz de proteger a la enzima de la inactivación de PLP.

Al modificar la enzima bacteriana con PLP 1 mM, NaBH₄ 2 mM, pH 8,0 y 37° ó PLP 0,1 mM NaBH₄ 2 mM, pH 10,56 y 37°, se produce una enzima de más de 95% inactiva y la capacidad para unirse a DNA se ve significativamente disminuída. Esto puede interpretarse suponiendo la modificación de otros residuos de lisina, que sí estarían involucrados en la unión al DNA. Este análisis es valedero también para la enzima I de levaduras, ya que los resultados obtenidos al modificarla con PLP 0,12 y 1,0 mM son comparables a los descritos para la RNA polimerasa de E. coli

Estos resultados indican la existencia de dos poblaciones de grupos aminos en las enzimas, distinguibles por su diferente reactividad con PLP y por el efecto diferente que su modificación produce en la acción de las enzimas. Un grupo constituido al parecer por 1-2 grupos amino en la enzima bacteriana y 3-4 en la enzima I de levaduras, reacciona rápidamente a baja concentración de PLP (0,1 y 0,12 mM respectivamente) produciendo la rápida inactivación de las enzimas. La modificación de ellos no afecta la capacidad de la enzima para unirse al DNA.

Poseen una alta reactividad a pH 8,0 debido a que, como se demostró para la enzima de E. coli, el pK_a es anormalmente bajo (pK_a 7,9). La otra población de grupos amino reacciona con PLP sólo cuando éste está en alta concentración (1mM), o en condiciones de alta temperatura (37°) y pH 10,56. La baja reactividad de estos grupos amino a pH 8,0 y el aumento de ella a pH 10,56 se debe a que posiblemente poseen un pK_a alto. La reacción de estos grupos afecta la unión de la RNA polimerasa al DNA y posiblemente están involucrados en este proceso. Hasta la fecha, la descripción de residuos ϵ -amino de lisina participando en la interacción de la RNA polimerasa con el DNA no se ha reportado en la literatura, sin embargo, estos resultados son consistentes con la proposición de su importancia en la interacción del DNA con otras proteínas (128).

2. Iniciación de la síntesis de RNA

Gran parte de esta investigación se ha dirigido hacia la modificación más selectiva, con el objeto de conocer si el efecto primario de la pérdida de actividad por incorporación de 1-2 moles de PLP en la RNA polimerasa de E. coli se debe a una alteración de las etapas de iniciación o elongación. Otros estudios han establecido que la modificación de grupos amino afecta la unión de nucleótidos (59). El uso de la técnica de marcación por afinidad ha sugerido también la importancia de un grupo amino de la enzima bacteriana en el proceso catalítico (60,61,129). Spoor y col. han utilizado el compuesto 6-metil-tioinosina-di-carboxialdehído (MMPR-OP) y han ubicado un grupo amino en el sitio de iniciación (130) sólo en base a evidencias cinéticas que son discutibles. Estos autores proponen que el compuesto MMPR-OP se une en el sitio de iniciación sólo porque el tipo de inhibición frente a UTP es competitivo, suponiendo que en las condiciones utilizadas se mide principalmente elongación. La inhibición producida por este compuesto es lenta (60) lo que invalida en parte el análisis cinético de inhibición. F. Y. Wu y C. W. Wu (61) sintetizaron un derivado fluorescente de este compuesto que resultó ser mejor inhibidor, apoyando los resultados de Spoor y col. Con estos antecedentes y considerando que PLP inactiva rápidamente a las RNA polimerasas, comparado con los compuestos citados anteriormente, se exploró el efecto de modificación de las enzimas con baja concentración de PLP en la reacción de iniciación. En estas

condiciones, aunque la unión al DNA no se ve afectada, los resultados indican que el intercambio de $^{32}\text{PP}_i$ dependiente de poli d(AT) y usando los ribonucleótidos complementarios como sustratos, está notoriamente reducido en ambas enzimas. Estos resultados, presentados en la tabla 2, indican además que este intercambio se reduce totalmente al modificar la enzima con PLP 1 mM, probablemente por bloqueo de la etapa previa (unión a DNA). También curiosamente se advierte cierto grado de intercambio (25%) de $^{32}\text{PP}_i$ con la enzima de E. coli, en ausencia de ATP. Esto también ha sido reportado por Krakow y Fronk (71) y se ha explicado porque ATP se utiliza en una concentración 100 veces menor que UTP en este ensayo, de modo que basta una contaminación de ATP del 1% (expresado en concentración molar) en el UTP comercial para observar un 100% de intercambio en ausencia de ATP. Otras explicaciones son posibles: la incorporación de **pppUpU** en una secuencia pdApdA del poli d(AT) o bien, la unión covalente de un ribonucleótido al DNA, usado simultáneamente como molde e iniciador. Esta reacción es catalizada por la RNA polimerasa de E. coli como ha sido descrito por Wickner y col. (131). Es posible suponer además un efecto adicional de PLP sobre el sitio de elongación ya que la reacción de intercambio no descarta totalmente esta posibilidad. Aunque Krakow y Fronk (71) concluyen que según su metodología, la reacción de intercambio refleja principalmente iniciación, ya que la RNA polimerasa de E. coli no elonga normalmente a bajas concentraciones de sustratos (112), ellos mismos proponen que

el uso de ADP o AMP como nucleótido iniciador en el ensayo, refleja exclusivamente intercambio de la etapa de iniciación. El ensayo de esta reacción con ADP y UTP indica que el tratamiento de la enzima bacteriana con PLP 0,1 mM reduce en un 90% la etapa de iniciación, en las mismas condiciones anteriores (tabla 3). Recientemente Armstrong y col. (132) utilizando un análogo de UTP, el formil-UTP, han demostrado también la participación de un grupo ϵ -amino de lisina en la iniciación de la síntesis del RNA. Esto también confirma los resultados aquí presentados. Sólo queda por esclarecer el rol específico en la iniciación de estos 1-4 grupos amino de las enzimas de E. coli y I de levaduras que reaccionan con PLP a bajas concentraciones. Es posible que sólo un grupo sea importante en esta etapa y participe en la unión del nucleótido iniciador o directamente en la formación del primer enlace fosfodiéster. También es factible que se requieran dos grupos amino para la unión de los nucleótidos a nivel del sitio de iniciación y el sitio de elongación. A la fecha no es posible distinguir estas posibilidades.

F. ESTUDIOS DE PROTECCION POR DNA, SUSTRATOS Y ANTIBIOTICOS

1. Protección medida por ensayo de actividad total

La cinética de inactivación por PLP de la RNA polimerasa de E. coli es algo influenciada por los sustratos nucleotídicos, sean éstos púricos o pirimídicos. Estudios de protección por

nucleótidos frente a la inhibición por PLP 0,1 mM sobre la actividad total de la enzima indican que la protección no es notoria, obteniéndose valores alrededor del 7-10% a concentraciones de nucleótidos entre 0,5 mM y 1 mM, valores bastante más altos que los de las K_m , que son del orden de 1×10^{-5} M (133). El efecto de los nucleótidos es escaso y no permite una conclusión acerca de este mecanismo de protección. Además, la interpretación de estos resultados es difícil, debido a un efecto inhibitorio en la síntesis de RNA al incrementar la concentración de nucleótidos, especialmente ATP, cuyo efecto inhibitorio ha sido descrito por algunos autores (134).

La reacción también es afectada por la presencia de DNA. Una concentración de 0,14 mg/ml de DNA de bacteriófago T_4 disminuye el % de inactivación de la enzima en aproximadamente 57%. DNA desnaturalado (una hebra) tiene un comportamiento similar al nativo. Cuando el DNA es agregado a una mezcla de enzima inhibida (E-PLP) es capaz de revertir la reacción, reactivando la enzima a un nivel semejante al alcanzado cuando se ha agregado desde un principio. Las protecciones por nucleótidos y por DNA son aditivas, lo que sugieren que protegen por un mecanismo diferente. La protección por DNA es cuantitativamente importante y sugiere que el sitio de acción del PLP se encuentra muy cercano o superpuesto con el sitio de unión del DNA en la enzima. Los resultados con la enzima de E. coli y DNA de timo de ternera son similares, demostrándose además, que la reacción no es revertida luego

de reducción del complejo enzima-PLP con NaBH_4 (figura 34). Los estudios de protección por sustratos y DNA obtenidos con la RNA polimerasa I de levaduras son similares (tabla 5). La protección por nucleósidos trifosfato es más efectiva (20-30%) y en especial por ATP y GTP. Esto concuerda con la proposición de que el sitio modificado se relaciona con la iniciación ya que en este proceso se utiliza preferentemente nucleótidos púricos como indicadores (116). La mayor protección se obtiene con DNA, GTP y CTP presentes simultáneamente (90%) y está de acuerdo con los resultados de marcación con PLP de las subunidades de la polimerasa I de levaduras. Esta protección casi total resulta también, como en el caso de la enzima bacteriana, de un efecto protector aditivo y probablemente diferente, del DNA y los sustratos nucleotídicos.

Según los resultados antes descritos, la reacción de inactivación por PLP es revertida por aminos. Podría pensarse que los nucleótidos o el DNA protegieran por este mecanismo, ya que poseen grupos amino con pK_a entre 2 y 5 (135), los que están desprotonados al pH de la reacción y podrían competir con el grupo amino de la enzima por el PLP. Sin embargo, esta posibilidad no parece probable, ya que la concentración de amina necesaria para revertir la reacción es del orden de 0,01 M, muy por encima de las concentraciones de nucleótidos y DNA usados. Una solución 0,14 mg/ml de DNA de fago T_4 es aproximadamente $2,8 \times 10^{-4}$ M en grupos amino, dato estimado a partir del P.M. del DNA de fago T_4 .

y la composición de bases nitrogenadas (113) y una solución de DNA de timo de ternero 0,17 mg/ml es 0,4 mM en grupos amino calculado en igual forma. Ambos DNA producen una gran protección y reversión en la reacción de inactivación de la polimerasa de E. coli, en cambio, comparativamente, una solución de Tris-HCl 0,4 mM, no produce recuperación alguna de la actividad enzimática.

En general, los resultados de protección por DNA sugieren que los grupos amino implicados en la etapa de iniciación están muy cerca de varios grupos catiónicos, probablemente pertenecientes al sitio de unión del DNA. Este se deduce básicamente si se supone que la unión entre DNA y RNA polimerasa es una interacción principalmente iónica (5). Es posible que aquí participan, tal vez interaccionando con los fosfatos del DNA, los otros grupos ϵ -amino de lisina, cuya modificación afecta radicalmente la unión de las enzimas al DNA.

2. Protección medida por incorporación del PLP-³H a la enzima

El efecto protector de DNA de fago T₄ y de timo de ternera frente a la reacción de inactivación, medida por ensayo de actividad en RNA polimerasa de E. coli, así como también la capacidad de revertir esta inactivación en ausencia de reducción con NaBH₄ (figura 33 y 34) sugieren que al unirse el DNA, éste cubre parte del sitio de iniciación que es compartido con los nucleótidos. Sin embargo, el DNA no protege a la enzima por consumo

del PLP presente ya que se demostró que ni DNA de timo de ternera, ni DNA de fago T₄, ni incluso los nucleósidos trifosfato reaccionan con PLP en las mismas condiciones. La ausencia de formación de base de Schiff entre PLP y los nucleótidos ATP, GTP y CTP, está relacionada posiblemente con alguna característica estructural de la base nucleotídica. Esto se concluye por la no reactividad entre adenina y PLP. Posiblemente una interacción hidrofóbica por superposición de los anillos del nucleótido y del PLP podría causar cierta restricción estérica en la reacción. El efecto protector de poli d(AT) y otros DNA puede deberse sólo a un impedimento estérico que limita la accesibilidad del PLP por la estrecha vecindad entre el sitio de unión de DNA y el sitio de iniciación. Probablemente, para que la incorporación de PLP ocurriera en presencia de DNA sería necesario que PLP pudiera formar puentes de hidrógeno con alguna base del DNA en analogía como lo hacen los sustratos. El efecto protector del poli d(AT) medido por restricción de la incorporación covalente de PLP-³H a la enzima de E. coli, da una evidencia directa que esto es así. Midiendo la incorporación de PLP-³H a la enzima es posible advertir claramente un efecto protector de los nucleótidos aún mayor que el producido por poli d(AT) y que es notoriamente preferencial para ATP. Los resultados anteriores indican una relación directa entre el sitio de reacción de PLP (en condiciones de incorporación de sólo 2 moles de PLP por mol de enzima bacteriana) y el sitio de iniciación en la RNA polimerasa de E. coli.

La rifampicina, un típico inhibidor de la iniciación de la síntesis de RNA en procariontes, no impide la accesibilidad de PLP-³H a la enzima de E. coli (figura 36). Esto indica que ambos compuestos se unen independientemente. Estos resultados contrastan con los de Armstrong y col. (129). Estos autores han utilizado un análogo de UTP que además es muy parecido a PLP, el 5-formil-UTP. Este compuesto reacciona con 2 grupos amino de la enzima. La rifampicina protege e impide en un 50% la modificación de estos residuos. No es posible establecer con los resultados de estos autores si la protección es de 50% para ambos residuos de lisina o sólo para uno de ellos. Posteriormente Armstrong y col. (132) han demostrado que basta la modificación de uno de estos residuos de lisina para inactivar la enzima. En relación a este último no se ha esclarecido el efecto protector de Rifampicina, sin embargo, nuestros resultados están de acuerdo con la proposición de Wu y Wu (61) que estiman en 37 \AA la separación de los sitios de iniciación y unión de rifampicina, en base a estudios de mediciones de transferencia energética (136). Estos autores estiman que el efecto de rifampicina en la iniciación no se efectúa directamente sobre el sitio de unión, sino que está mediado a través de la molécula de enzima.

El derivado de rifampicina AF/013, tiene un efecto diferente sobre la incorporación de PLP-³H en la polimerasa (figura 36). Este compuesto incubado previamente con la enzima es capaz de

disminuir la incorporación de PLP-³H y este efecto se explica fácilmente en base al mecanismo de inhibición propuesto por Riva y col. para este inhibidor general de polimerasas (137). AF/013 forma una pantalla hidrofóbica alrededor de la enzima y se une con una estequiometría aproximadamente de 500 moles/mol de enzima lo cual limita todo acceso a la enzima.

G. MARCACION DE LAS SUBUNIDADES DE LAS ENZIMAS CON PLP

Al analizar la incorporación de PLP en la RNA polimerasa de E. coli, con PLP-³H o por reducción con NaD-³H₄, se encontró que se marcan las subunidades β' , β y α . La subunidad σ no incorpora radiactividad significativa. Esto último podría explicarse en base a la baja relación estequiométrica de la subunidad σ encontrada en algunos métodos de purificación de esta enzima (138,139). Sin embargo, la incorporación de PLP en esta subunidad no sobrepasa el 6% de la radiactividad asociada a la enzima. Con el método de purificación utilizado (15) se obtiene el 80% de la enzima con factor σ unido. La incorporación de PLP en las subunidades β' , β y α podría sugerir poca selectividad en el reactivo modificador. Aunque el análisis de la incorporación de radiactividad en las subunidades separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS no permite discriminar claramente entre β' y β (pesos moleculares muy similares), la marcación de la subunidad α puede explicarse

en base a la existencia de otros sitios de unión de nucleótidos en esta enzima, no necesariamente relacionados con la catálisis. Estos son sitios potenciales para reaccionar con PLP. Este concuerda con la proposición de Marcus (120) que sugiere un mecanismo común en la unión de enzimas y nucleótidos o coenzimas nucleotídicas, representado parcialmente por la participación de residuos ϵ -amino de lisina en esta interacción. La enzima de E. coli sufre adenililación (19) y fosforilaciones (18, 140) especialmente en la subunidad α . La subunidad α aislada o ensamblada en la enzima posee actividad poli A polimerásica (141) y este implica además, la existencia de sitios de unión de ATP. El efecto protector del DNA no muestra preferencia por alguna subunidad, apoyando la idea que este mecanismo de protección se relaciona más bien con un bloqueo de los residuos de lisina más reactivos, causado por impedimento estérico.

En la enzima I de levaduras la situación es más clara. De las 11 subunidades descritas (37) sólo 3 se marcan con PLP. Estas corresponden a los polipéptidos de peso molecular 185.000, 48.000 y 37.000. Esto sugiere que alguno de ellos esté implicado en la actividad polimerásica. Según indicaciones recientes, las subunidades de 48.000 y 36.000 no son absolutamente necesarias para la actividad enzimática (142) ya que puede obtenerse una preparación que carece de ellas y la enzima aún es activa aunque presenta ciertas alteraciones funcionales (142-144). De esto se concluye que la pérdida de actividad de esta enzima por

reacción con PLP se debe probablemente a la interacción de éste con la subunidad de P.M. 185.000 y ésta sería la subunidad que sustenta el sitio activo. Esta idea se comprueba con los experimentos de protección preferencial por nucleótidos hacia la subunidad de P.M. 185.000 (figura 39) cuando se marcan las subunidades de la polimerasa I con PLP. Este sitio de reacción de PLP está cercano o forma parte, del sitio de iniciación ya que se demostró que la pérdida de actividad por PLP se relaciona con la reducción del intercambio de $[^{32}\text{P}] \text{PP}_i$. Los datos anteriores también sugieren que las subunidades de peso molecular 48.000 y 36.000 no están relacionadas con la unión de nucleótidos a la enzima. La protección por DNA frente a la marcación de las subunidades de la polimerasa I con PLP, se cumple también para aquella de P.M. 185.000 (como debe esperarse para un sitio de iniciación) y sugiere para las subunidades de P.M. 48.000 y 36.000 una cierta relación con la interacción del DNA con esta RNA polimerasa. Esto concuerda con los resultados de Huet y col. (142) que indican para éstas subunidades cierto rol en la transcripción, ya que su presencia aumenta la razón de actividades DNA nativo/poli d(AT).

H. CARACTERISTICAS DEL SITIO ACTIVO DE RNA POLIMERASAS. POSIBLE ANALOGIA ENTRE PROCARIONTES Y EUCARIONTES

Es posible integrar los resultados presentados con la información existente de la literatura con el fin de caracterizar

un poco más el sitio activo de las RNA polimerasas. Para esto se comparan ciertos rasgos estructurales similares de las enzimas de diversas fuentes. En general, se ha propuesto que todas las nucleotidil transferasas son Zn-metaloenzimas (145). Es to ha sido demostrado para la enzima de E. coli (146) y recientemente se ha demostrado la presencia de Zn en la enzima I de levadura (147). En todos los casos, la remoción de Zn^{2+} con agentes quelantes produce una pérdida de la actividad enzimática. Esto parece ser un rango común de las RNA polimerasas y se supone que Zn participaría directa o indirectamente en el proceso catalítico. De un análisis comparativo de la estructura cuaternaria de estas enzimas es posible obtener también ciertas similitudes. Es una característica general que todas las RNA polimerasas de procariontes poseen 2 subunidades mayores de peso molecular semejante (β' y β) y al menos 2 subunidades menores de peso molecular diferente (γ y α) salvo algunas excepciones como Halobacterium cutirubrum que sólo tiene 2 subunidades diferentes de peso molecular 18.000 (148) y Acinetobacter calcoaceticus (149) que no posee subunidad β' . En ciertos casos, la enzima bacteriana aparece con otras subunidades menores como se ha descrito en algunos procesos de infección por fagos (10-12) y en esporogénesis (20). Las RNA polimerasas eucarióticas también poseen 2 subunidades mayores de peso molecular semejante y numerosas subunidades menores de una amplia gama en pesos moleculares (6). Se sugiere que el asiento físico del

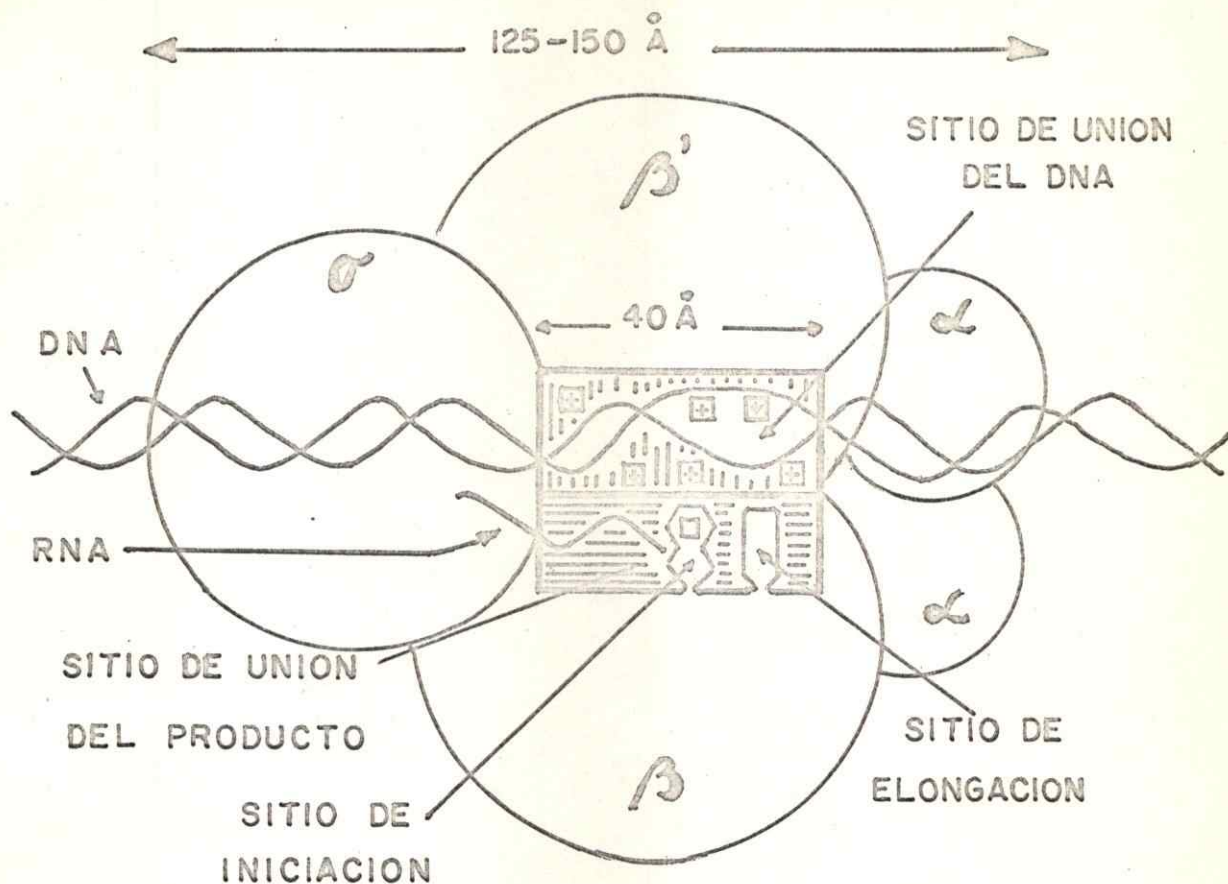
sitio activo de estas enzimas reside en las subunidades mayores ya que en procariontes al menos se ha demostrado que en la subunidad β está el sitio de unión de ciertos antibióticos (47,49) que bloquean específicamente su actividad. En esta subunidad también se ha ubicado el sitio de iniciación y la participación de un grupo ϵ -amino de lisina en este proceso (60,61). Los resultados presentados en esta tesis concuerdan con esta idea, aunque los experimentos de marcación de las subunidades de la enzima de E. coli con PLP afectan también a la subunidad α . En eucariontes, el sitio activo parece estar también en las subunidades mayores, como se ha demostrado en la enzima I de levadura, por los resultados de marcación de las subunidades con PLP, el efecto de protección por nucleótidos y los estudios de intercambio de $^{32}\text{PP}_i$ que señalan al sitio de iniciación ubicado en la subunidad de P.M. 185.000. La existencia de subunidades menores no esenciales para la actividad descrita en levadura, también se ha reportado en la enzima I de timo de ternera (150) y apunta hacia el hecho que las subunidades responsables de la actividad catalítica deben ser las subunidades mayores. Esto es muy claro en la enzima de E. coli donde una de las subunidades menores (\mathcal{T}) puede omitirse y la capacidad catalítica de la enzima no se pierde aunque su selectividad transcripcional está restringida. También se ha sugerido para la enzima procariótica que β' sería la responsable en gran parte de unir el DNA (151) siendo ésta, una etapa inicial del proceso catalítico. En

eucariontes no se ha establecido la participación específica de alguna subunidad de estas enzimas en la interacción con el DNA. Además de los resultados antes comentados, se ha establecido otro rasgo común de las RNA polimerasas: la participación de unos pocos (1 a 4) residuos de ϵ -amino de lisina en el proceso catalítico de iniciación de la síntesis de RNA. Estos grupos tendrían la característica común de ser muy reactivos frente a PLP porque poseen bajo valor de pK_a . Esta característica se explica si los grupos ϵ -amino de lisina están enclavados en un ambiente hidrofóbico o bien cercanos a una región con numerosas cargas positivas. Cualquiera de las 2 explicaciones es satisfactoria. Es necesario probablemente un tipo de interacción hidrofóbica para la unión de los sustratos, como lo sugiere la proximidad de residuos de triptófano en el sitio de iniciación (117) y en parte, talvez, para la unión del DNA, en analogía a interacciones entre DNA y ciertas proteínas de bacteriófagos (128, 152) como también por estudios de unión entre DNA y polipéptidos sintéticos (153). Por otra parte se ha postulado una interacción fundamentalmente iónica (154) entre el DNA y la RNA polimerasa de E. coli (interacción no necesariamente relacionada con la especificidad requerida en el reconocimiento de promotores). Esto se sugiere por la necesidad de residuos fuertemente básicos en la enzima, para neutralizar los grupos fosfatos del DNA. (154). Los resultados de esta tesis demuestran además la participación de varios otros residuos de lisina en el proceso de unión del DNA

en la enzima de E. coli y probablemente en la enzima I de levaduras. Esto parece ser también un rasgo común en el sitio activo de las RNA polimerasas.

Gran parte de la información comentada puede resumirse en un modelo tentativo del sitio activo de la polimerasa bacteriana (figura 40) de la cuál se conocen más antecedentes. En él se ha representado:

- a) El sitio de unión del DNA ubicado en la subunidad β' de la enzima. Esta idea ha sido inferida en base a que esta subunidad interactúa fuertemente, aún en presencia de urea, con fosfocelulosa (155,156) y heparina (151), un polianión que bloquea la capacidad de la enzima para unir DNA. La subunidad β' es la más básica (151), es decir, con el mayor contenido de lisinas y argininas en relación a las otras subunidades (127) lo que sugiere la existencia de una región con alta densidad de carga positiva. Se ha confirmado además que ésta es la subunidad aislada que une preferentemente al DNA (151,157). Los resultados presentados aquí indican que aproximadamente 21 residuos ϵ -amino de lisina (algunos de ellos supuestamente pertenecientes a la subunidad β' y representados en la figura 40 como cargas positivas $\boxed{+}$) reaccionan con PLP aproximadamente 1 mM, causando una completa reducción de la capacidad de la enzima para unirse a DNA. Esta reactividad también se manifiesta si la reacción de modificación de la enzima se realiza con baja



GRUPO REACCIONANTE	SUBUNIDAD	FUNCION ALTERADA	CONDICIONES		
			PLP	pH	t°
ϵ -NH ₂ LYS pK 7.9 (□)	β	INICIACION	0.1 mM	8.0	0°, 37°
ϵ -NH ₂ LYS pK 10.5 (■)	β'	UNION A DNA	1.0 mM 0.1 mM	8.0 10.5	37° 37°

Figura 40. Modelo del sitio activo de la RNA polimerasa de *E. coli*. Se indica la participación de grupos ϵ -amino de lisina en el sitio activo, su posible ubicación en las diferentes subunidades y su rol en el proceso de síntesis de RNA. Se incluyen otros detalles descritos en la literatura que se integran y comentan en la Discusión.

concentración de PLP (0,1 mM) pero a pH 10,5. Esto sugiere que los grupos ϵ -amino de lisina tienen valores de pK_a normales ($pK_a \approx 10,5$) como se confirma por los estudios cinéticos de inactivación por PLP en función del pH. En relación al sitio de unión del DNA y suponiendo una diámetro para la enzima de E. coli de aproximadamente 150 \AA (158,159) ésta puede cubrir un largo aproximado de 44 pares de bases nucleotídicas arregladas según el modelo de Watson y Crick (4). Esta longitud del DNA representa alrededor de cuatro vueltas de la doble hélice y concuerda con la extensión propuesta para el promotor (40 pares de bases) que es protegida frente a la degradación por nucleasas (160-163). Si se considera la proposición de ciertos autores en relación a la subunidad α y su posible interacción con el DNA (156), la región del DNA que interactúa con β' debe ser más pequeña. Esto es consistente con la idea de algunos autores que definen dentro del promotor el sitio de unión de la polimerasa que contiene el punto de iniciación de la transcripción y cuya longitud varía entre 9 y 14 pares de bases (164,165). Parte de este segmento de doble hebra se abre para que se inicie la transcripción (164,166). En relación a este hecho, la participación de la subunidad σ en la selección del promotor no parece realizarse por una interacción directa con el DNA, sino que a través de la molécula de enzima básica mediante un cambio conformacional que produce un drástico incremento

de la afinidad de la enzima para reconocer selectivamente los promotores (170). Los experimentos de protección por DNA frente a la inactivación y a la marcación de las subunidades de la enzima de E. coli por PLP concuerdan con este planteamiento.

- b) Los sitios de iniciación y elongación asignados a la subunidad β de la RNA polimerasa por razones antes comentadas. Es probable que en ambos, o al menos en el sitio de iniciación (representado por un anillo purínico), se ubique un grupo ϵ -amino de lisina altamente reactivo hacia PLP, de pK_a 7,9 (esquemático sin carga \square) y cuyo bloqueo produce la incapacidad de la enzima para iniciar la síntesis de RNA. Este grupo estaría en un ambiente hidrofóbico (sitio de unión de nucleótidos) o cercano a una región con varias cargas positivas (sitio de unión del DNA). Algunos autores han propuesto una separación de $5 \overset{0}{\text{Å}}$ entre el sitio de iniciación y el de elongación en base al largo de un enlace fosfodiéster (130). Es posible también establecer una estrecha vecindad de estos sitios con el de unión del DNA; ya que es necesario la formación de pares de bases complementarias a través de enlaces de hidrógeno entre los nucleótidos entrantes y el DNA.
- c) Un sitio de unión del producto (RNA) ubicado en la subunidad β que incluirá los sitios de elongación e iniciación en una extensión de aproximadamente 12 pares de bases, comparable en extensión al sitio de unión del DNA. Este sitio

ha sido propuesto por Kumar y Krakow (167) para la polimerasa de Azotobacter vinelandii en base a estudios de protección frente a nucleasas, del RNA unido a la enzima. El segmento protegido consta de 12 bases nucleotídicas. Se ha considerado que el sitio de anclaje de la subunidad σ en la enzima básica esté relacionado con el sitio de unión del producto en base a la proposición que la liberación de σ del complejo activo (RNA polimerasa-DNA-RNA) se logra por desplazamiento causado por el producto, cuando éste ha alcanzado un largo crítico de 10 nucleótidos (168). El modelo propuesto en la figura 40 incluye la distribución espacial de las subunidades de la enzima bacteriana sugerida por Lill y Hartmann (169). No se ha representado el sitio de unión de rifampicina aunque ciertos autores han propuesto una separación de 37 \AA entre el sitio de iniciación y el sitio de unión del antibiótico (61). Recientemente se ha estimado una separación de 27 a 38 \AA entre la superficie de la subunidad σ y el sitio de unión de rifampicina, en base a estudios de transferencia energética (171). Este modelo requerirá de una comprobación experimental más detallada y será necesario un estudio estructural avanzado y exhaustivo, secuencia de aminoácidos de las subunidades y análisis de estructura terciaria por cristalografía de rayos X por ejemplo, para conocer en detalle el sitio activo de las RNA polimerasas e introducirse en el mecanismo de catálisis de la síntesis de RNA.

BIBLIOGRAFIA

1. S.B. WEISS, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 46, 1020-1030 (1960)
2. J. HURWITZ, J.J. FURTH, M. ANDERS, P.J. ORTIZ y J.T. AUGUST, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 26, 91-100 (1961)
3. F. JACOB y J. MONOD, J. Mol. Biol., 3, 318-356 (1961)
4. J.D. WATSON y F.H.C. CRICK, Nature, 171, 737 (1953)
5. R. BURGESS, Ann. Rev. Biochem., 40, 711-740 (1971)
6. P. CHAMBON en "The Enzymes", (P.D. BOYER, editor), Vol X, 261-331, Academic Press, New York (1974)
7. P. CHAMBON, Ann. Rev. Biochem., 44, 613-638 (1975)
8. P.R. CHAKRABORTY, P. SARKAR, H.R. HUANG y U. MAITRA, J. Biol. Chem., 248, 6637-6646 (1973)
9. M. CHAMBERLIN, J. McGRATH y L. WASKELL, Nature, 228, 227-230 (1970)
10. A. STEVENS, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 69, 603-607 (1972)
11. T.D. FOX y J. PERO, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 71, 2761-2765 (1974)
12. J.J. DUFFY y E.P. GEIDUSCHEK, J. Biol. Chem., 250, 4530-4541 (1975)
13. D. BERG, K. BARRET y M.J. CHAMBERLIN en "Methods in Enzymology" (K. MOLDAVE y L. GROSSMAN, editores), Vol XXI, parte D, 506-519, Academic Press, New York, (1971)
14. R.R. BURGESS, J. Biol. Chem., 244, 6160-6167 (1969)
15. R.R. BURGESS y J. JENDRISAK, Biochemistry, 14, 4634-4638 (1975)
16. H. STERNBACH, R. ENGELHARDT y A.G. LEZIUS, Eur. J. Biochem., 60, 51-55 (1975)

17. R.R. BURGESS, A.A. TRAVERS, J.J. DUNN y E.K.F. BAUTZ, Nature, 222, 537-540 (1969)
18. H.R. HORVITZ, J. Mol. Biol., 90, 727-738 (1974)
19. C.G. GOFF, J. Biol. Chem., 249, 6181-6190 (1974)
20. T. LINN, A.L. GREENLEAF y R. LOSICK, J. Biol. Chem., 250, 9256-9261 (1975)
21. J.P. BOUCHE, K. ZECHEL y A. KORNBERG, J. Biol. Chem., 250, 5596-6001 (1975)
22. R.C. DICKSON, J. ABELSON, W.M. BARNES y W.S. REZNIKOFF, Science, 187, 25-35 (1975)
23. K. BERTRAND, C. SQUIRES y C. YANOFSKY, J. Mol. Biol., 103, 319-337 (1976)
24. P.H. POWWELS y J.V. ROTTERDAM, Molec. gen. Genet., 136, 215-226 (1975)
25. T. KASAI, Nature, 249, 523-527 (1974)
26. R.G. ROEDER: Disertación Doctoral, Universidad de Washington, Washington, U.S.A., (1969)
27. R.G. ROEDER y W.F. RUTTER, Nature, 224, 234-237 (1969)
28. R.G. ROEDER y W.F. RUTTER, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 65, 675-682 (1970)
29. S.P. BLATTI, C.J. INGLES, T.J. LINDELL, P.W. MORRIS, R.F. WEAVER, F. WEINBERG y W.J. RUTTER, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 35, 649-657 (1970)
30. E. ZYLBER y S. PENMAN, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 68, 2861-2865 (1975)
31. R. WEINMANN y R.G. ROEDER, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 71, 1790-1794 (1974)
32. V.E.F. SKLAR, L.B. SCHWARTZ y R.G. ROEDER, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 72, 348-352 (1975)
33. P. VALENZUELA, G.L. HAGER, F. WEINBERG y W.J. RUTTER, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 73, 1024-1028 (1976)
34. S.T. JACOB, Prog. Nucl. Acid. Res., 13, 93-126 (1973)

35. P. HOSSENLOPP, D. WELLS y P. CHAMBON, *Eur. J. Biochem.*, 58, 237-251 (1975)
36. L.B. SCHWARTZ, V.E.F. SKLAR, J.A. JAEHNING, R. WEINMANN y R.G. ROEDER, *J. Biol. Chem.*, 249, 5889-5997 (1974)
37. P. VALENZUELA, F. WEINBERG, G.I. BELL y W.J. RUTTER, *J. Biol. Chem.*, 251, 1464-1470 (1976)
38. M. COCHET-MEILHAC, P. NURET, J.C. COURVALIN y P. CHAMBON, *Biochim. Biophys. Acta*, 353, 185-192 (1971)
39. L.B. SCHWARTZ y R.G. ROEDER, *J. Biol. Chem.*, 249, 5898-5906 (1974)
40. F. GISSINGER y P. CHAMBON, *Eur. J. Biochem.*, 28, 274-282 (1972)
41. C. KEDINGER y P. CHAMBON, *Eur. J. Biochem.*, 28, 283-290 (1972)
42. H. PONTA, U. PONTA y E. WINTERSBERGER, *Eur. J. Biochem.*, 29, 110-118 (1972)
43. S. DEZELEE y A. SENTENAC, *Eur. J. Biochem.*, 34, 41-52 (1973)
44. J.M. BUHLER, A. SENTENAC y P. FROMAGEOT, *J. Biol. Chem.*, 249, 5963-5970 (1974)
45. E. KREBS y P. CHAMBON, *Eur. J. Biochem.*, 61, 15-25 (1976)
46. R.G. ROEDER en "RNA Polymerase" (M. CHAMBERLIN y R. LOSICK, editores), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., en prensa
47. D. RABUSSAY y W. ZILLIG, *FEBS Lett.*, 5, 104-106 (1969)
48. A. HEIL y W. ZILLIG, *FEBS Lett.*, 11, 165-168 (1970)
49. D.H. BOYD, W. ZILLIG y F.J.G. SCAIFE, *Molec. gen. Genet.*, 130, 315-320 (1974)
50. Y. IWAKURA, A. ISHIHAMA y T. YURA, *Molec. gen. Genet.*, 121, 181-196 (1973)
51. S.R. PANNY, A. HEIL, B. MAZUS, P. PALM, W. ZILLIG, S.Z. MINDLIN, T.S. ILYINA y R.B. KHESIN, *FEBS Lett.*, 48, 241-245 (1974)

52. P. THONART, J. BECHET, F. HILGER y A. BURNY, *J. Bacteriol.*, 125, 25-32 (1976)
53. T.J. LINDELL, F. WEINBERG, P.W. MORRIS, R.G. ROEDER y W.J. RUTTER, *Science*, 170, 447-449 (1970)
54. M. COCHET-MEILHAC y P. CHAMBON, *Biochim. Biophys. Acta*, 353, 160-184 (1974)
55. V.L. CHAN, G.F. WITHMORE y L. SIMINOVITCH, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 69, 3119-3123 (1972)
56. S. TSUJI, K. SUZUKI y K. IMAHORI, *Nature*, 261, 725-726 (1976)
57. D.S. SIGMAN y G. MOOSER, *Ann. Rev. Biochem.*, 44, 889-930 (1975)
58. S.J. SINGER, *Advan. Protein. Chem.*, 22, 1-54 (1967)
59. A. ISHIHAMA y J. HURWITZ, *J. Biol. Chem.*, 244, 6668-6689 (1969)
60. J. NIXON, T. SPOOR, J. EVANS y D. KIMBALL, *Biochemistry*, 11, 4570-4572 (1972)
61. F.Y. WU y C.W. WU, *Biochemistry* 13, 2562-2566 (1974)
62. F.Y. WU y C.W. WU, *Biochemistry*, 12, 4343-4348 (1973)
63. L.R. YARBROUGH y C.W. WU, *J. Biol. Chem.*, 249, 4079-4085 (1974)
64. B.H. HICHOLOSON y A.M.Q. KING, *Eur. J. Biochem.*, 37, 575-584 (1973)
65. P. GREENWELL, S.L. JEWETT y G.R. STARK, *J. Biol. Chem.*, 248, 5994-6001 (1973)
66. M. ANAI, C.Y. LAI y B.L. HORECKER, *Archives of Biochem. Biophys.*, 156, 712-719 (1973)
67. G.E. MEANS y R.E. FEENEY, *J. Biol. Chem.*, 246, 5532-5533 (1971)
68. G. COLOMBO, E. HUBERT y F. MARCUS, *Biochemistry*, 11, 1798-1803 (1972)
69. O.W. JONES y P. BERG, *J. Mol. Biol.*, 22, 199-209 (1966)

70. D.C. HINCKLE, M.J. CHAMBERLIN, J. Mol. Biol., 70, 157-185 (1972)
71. J. KRAKOW y E. FRONK, J. Biol. Chem., 244, 5899-5993 (1969)
72. V. HERVERT, K-S. LAU, C.W. GOTTLIEB y S.J. BLEICHER, J. Clin. Endocrinol., 25, 1375-1384 (1965)
73. J.P. RICHARDSON, Proc. Nat. Acad. Sc. U.S.A., 55, 1616-1623 (1966)
74. J.S. KRAKOW y S.P. GOOLSBY, Biochem. Biophys. Res. Commun., 44, 453-458 (1971)
75. W.F. MANGEL, Archives Biochem. Biophys., 163, 172-177 (1974)
76. B.M. ALBERTS, F.J. AMOBIO, M. JENKINS, E.D. GUTMANN y F.L. FERRIS, Cold Spring Harbor Symp. Quant., 33, 289-305 (1968)
77. C. KEDINGER, F. GISSINGER, M. GNIAZDOWSKI, J. MANDEL y P. CHAMBON, Eur. J. Biochem., 28, 269-274 (1972)
78. C.C. WIDNELL y J.R. TATA, Biochem. J., 92, 313-317 (1964)
79. J.L. MANDEL y P. CHAMBON, FEBS Lett., 15, 175-180 (1971)
80. L.H. KIRKEGAARD, T.J.A. JHONSON y R.M. BOCK, Anal. Biochem., 50, 122-138 (1972)
81. M.M. BHARGAVA y H.O. HALVORSON, J. Cell. Biol., 49, 423-429 (1971)
82. G.L. HAGER y M. HOLLAND, Comunicación personal
83. N.R. EATON, J. Bacteriol., 83, 1359-1362 (1962)
84. "BIOCHEMISTS' HANDBOOK", (C.A. LONG, editor), 19-45, D. Van Nostrand Company, New York (1961)
85. C.A. THOMAS y J. ABELSON en "Procedures in Nucleic Acid Research", (G.L. CANTONI y D.R. DAVIES, editores), 533-561, Harper and Row, New York (1966)
86. S. ZAMENHOF, G. GRIBOFF y N. MARULLO, Biochim. Biophys. Acta, 13 459-470 (1954)

87. B.M. ALBERTS y G. HERRICK en "Methods in Enzymology", Vol XXI, parte D, 198-217, (L. GROSSMAN y K. MOLDAVE, editores), Acad. Press, New York (1971)
88. K. BURTON, Biochem. J., 62, 315-323 (1956)
89. A. STOCK, F. ORTANDELL y G. PFLEIDERER, Biochem, Z., 344, 353-360 (1966)
90. J. ATTENBORROW, J. Chem. Soc., 1104-1108 (1952)
91. E.A. PETERSON y H.A. SOHER, J. Am. Chem. Soc., 76, 169-173 (1954)
92. H. AHRENS, W. KORYTNYK, Anal. Biochem., 36, 413-420 (1969)
93. M. HOCHBERG, D.M. MELNICK y B.L. OSER, J. Biol. Chem., 155, 109-117 (1944)
94. W.M. BONNER y R.A. LASKEY, Eur. J. Biochem., 46, 83-88 (1974)
95. O. RAIBAUD y M.E. GOLDBERG, FEBS Lett., 40, 41-44 (1974)
96. K.D. SCHNACKERZ y E.A. NOLTMAN, Biochemistry, 10, 4837-4842 (1971)
97. S. SHAPIRO, M. ENSER, E. PUGH y B.L. HORECKER, Archives Biochem. Biophys., 128, 554-562 (1968)
98. U.K. LAEMMLI, Nature, 227, 680-685 (1970)
99. R.A. LASKEY y A.D. MILLS, Eur. J. Biochem., 56, 335-341 (1975)
100. Preparation of samples for liquid scintillation counting, Sección 140, sistema 106. Amersham-Searle Corporation (1967)
101. O.H. LOWRY, N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR y R.J. RANDALL, J. Biol. Chem., 193, 265-276 (1951)
102. E.C. SNELL, Vitamins and Hormones, 16, 77-125 (R.S. HARRIS, G.F. MARRIAN y K.V. THIMANN, editores) Academic Press Inc. New York (1958)
103. D.E. METZLER, J. Amer. Chem. Soc., 79, 485-491 (1957)

104. F.M. FISCHER, A.W. FORRER, J.L. HEDRICK, R.C. HUGHES, A.B. KENT y E.G. KREBS en "Chemical Aspects of pyridoxal catalysis", pág. 554, (E.E. SNELL, P.M. FASELLA, A. BRONSTEIN y A. ROSSI-FANELLI, editores), Pergamon, New York (1963)
105. P.H. von HIPPEL y K-Y. WONG, J. Mol. Biol., 61, 587-613 (1971)
106. B. SETLON y T.E. MANSOUR, Biochim, Biophys. Acta, 258, 106-112 (1972)
107. P. SUTTER y J.P. ROSENBUSCH, Eur. J. Biochem., 54, 293-299 (1975)
108. T.D. KEMPE y G.R. STARK, J. Mol. Biol., 250, 6861-6869 (1975)
109. G. RHODES y M. CHAMBERLIN, J. Biol. Chem., 249, 6675-6683 (1974)
110. U. MAITRA y J. HURWITZ, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 54, 815-822 (1965)
111. E. di MAURO, L. SNYDER, P. MARINO, A. LAMBERTI, A. COPPO y G.P. TOCCHINI-VALENTINI, Nature, 222, 533-537 (1969)
112. J. DARLIX y P. FROMAGEOT, Biochimie, 54, 47-54 (1972)
113. "HANDBOOK OF BIOCHEMISTRY SELECTED DATA FOR MOLECULAR BIOLOGY", (H.A. SOBER, editor), 2a. edición, pág. H9, The Chemical Rubber Co., Cleveland, Chile (1970)
114. A. KORNBERG, Science, 131, 1503-1508 (1960)
115. CATALOGO DE SIGMA CHEMICAL CO., pág. 133 (1974)
116. D.D. ANTHONY, C.W. WU y D.A. GOLDTHWAIT, Biochemistry, 8, 246-256 (1969)
117. C.W. WU y D.A. GOLDTHWAIT, Biochemistry, 8, 4450-4458 (1969)
118. C.W. WU y D.A. GOLDTHWAIT, Biochemistry, 8, 4458-4469 (1969)
119. W. WERLI y M. STAEHELIN, Bacteriol. Rev., 35, 290-309 (1971)
120. G. COLOMBO y F. MARCUS, Biochemistry, 13, 3085-3091 (1974)
121. S-S CHEN y P.C. ENGEL, Biochem J., 149, 619-626 (1975)
122. D. PISZKIEWICZ y E.L. SMITH, Biochemistry, 10, 4544-4552 (1971)

123. G.M. HASS y H. NEURATH, *Biochemistry*, 10, 3535-3540 (1971)
124. "HANDBOOK OF BIOCHEMISTRY SELECTED DATA FOR MOLECULAR BIOLOGY" (H.A. SOBER, editor), 2a. edición, pág. J.225, The Chemical Rubber.Co., Cleveland, Ohio (1970)
125. "PROGRESS IN PHYSICAL ORGANIC CHEMISTRY", (W.P. JENCKS, editor), Vol. II, pág. 110, John Wiley Intercience Publishers (1965)
126. L.A. COHEN en "The Enzymes", (P. BOYER, editor), Vol. I, 3a. edition, 154, Academic Press, New York (1970)
127. H. FUJIKI y G. ZUREK, *FEBS Lett.*, 55, 242-244 (1975)
128. R.A. ANDERSON y N.A. KASHIMA y J.E. COLEMAN, *Biochemistry*, 14, 907-917 (1975)
129. V.W. ARMSTRONG, H. STERNBACH, F. ECKSTEIN, *FEBS Lett.*, 44, 157-159 (1974)
130. T.C. SPOOR, E. PERSICO, J. EVANS y A.P. KIMBALL, *Nature*, 227, 57-59 (1970)
131. S. WICKNER, J. HURWITZ, K. NATH y L. YARBROUGH, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 48, 619-627 (1972)
132. Y.W. ARMSTRONG, H. STERNBACH y F. ECKSTEIN, *Biochemistry*, 15, 2086-2090 (1976)
133. M. SUGIURA, T. OKAMOTO y M. TAKANAMI, *Nature*, 225, 598-600 (1970)
134. P. EZCURRA, E. de ROBERTIS, N. YUDEWICZ y H. TORRES en "Gene Expression and its Regulation", (F.T. KENNEY, B.A. HAMKALO, G. FAVELUKES y J.T. AUGUST, editores), 53-61, Plenum Press, New York, London (1973)
135. D.O. JORDAN en "The Nucleic Acids", (E. CHARGAFF y J.N. DAVIDSON, editores), Vol I, 447-492, Academic Press Publishers, New York (1955)
136. L. STRYER y R.D. HAUGLAND, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 58, 719-726 (1967)
137. S. RIVA, A. FIETTA y L. SILVESTRI, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 49, 1263-1271 (1972)

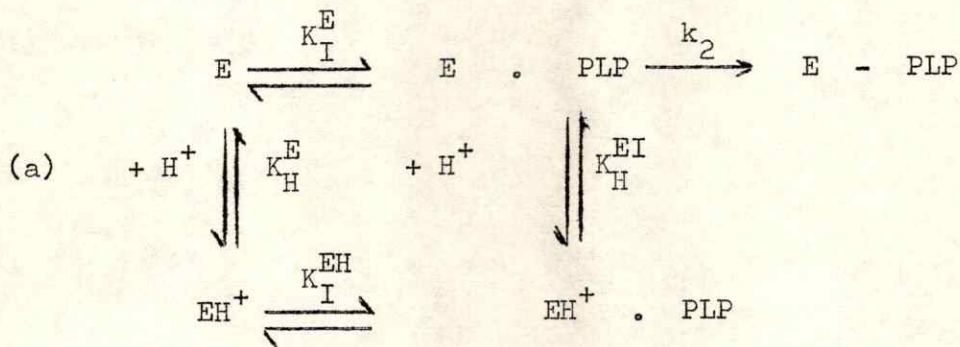
138. D.J. Mc.CONNELL y J. BONNER, *Biochemistry*, 11, 4329-4336 (1972)
139. W. ZILLIG, K. ZECHEL y H.J. HALBSWACHS, *HOPPE-ZEYLER'S Z. Physiol. Chem.*, 351, 221-224 (1970)
140. W. ZILLIG, H. FUJIKI, W. BLUM, D. JANEKOVIC, M. SCHWEIGER, H. RAHMSDORF, H. PONTA y M. HIRSCH-KAUFMANN, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 72, 2506-2510 (1975)
141. S. OHASA y A. TSUGITA, *Nature New Biol.*, 240, 35-38 (1972)
142. J. HUET, J. BUHLER, A. SENTENAC y P. FROMAGEOT, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 72, 3034-3038 (1975)
143. J. HUET, S. DEZELEE, F. IBORRA, J.M. BUHLER, A. SENTENAC y P. FROMAGEOT, *Biochimie*, 58, 71-80 (1976)
144. A. SENTENAC, P. FROMAGEOT, J.M. BUHLER y F. IBORRA en "RNA Polymerase", (M. CHAMBERLIN y R. LOSICK, editores), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, en prensa
145. P. VALENZUELA, R.W. MORRIS, A. FARAS, W. LEVINSON y W.J. RUTTER, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 53, 1036-1041 (1973)
146. M.C. SCRUTTON, C.W. WU y D.A. GOLDTHWAIT, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 68, 2497-2501 (1971)
147. D.S. AULD, I. ATSUYA, C. CAMPINO y P. VALENZUELA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 69, 548-554 (1976)
148. B.G. LOUIS y P.S. FITT, *Biochem. J.* 127, 69-80 (1972)
149. R.K. KLEPPE y K. KLEPPE, *J. Bacteriol.*, 125, 435-443 (1976)
150. F. GISSINGER y P. CHAMBON, *FEBS Lett.*, 58, 53-56 (1975)
151. W. ZILLIG, K. ZICHEL, D. RABUSSAY, M. SCHACHNER, V.S. SETHI, P. PALM, A. HEIL y W. SEIFERT, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 35, 47-58 (1970)
152. H.T. PRETORIUS, M. KLEIN y L.A. DAY, *J. Biol. Chem.*, 250, 9262-9269 (1975)
153. E.J. GABBAY, P.D. ADAWAADKAR y W.D. WILSON, *Biochemistry*, 15, 146-151 (1976)
154. M.T. RECORD, P. de HASETH y T. LOHMAN, *J. Mol. Biol.*, en prensa

155. R.R. BURGESS, J. Biol. Chem., 244, 6168-6176 (1969)
156. L.Y. YARBROUGH y J. HURWITZ, J. Biol. Chem., 249, 5400-5404 (1974)
156. L.Y. YARBROUGH y J. HURWITZ, J. Biol. Chem., 249, 5400-5404 (1974)
157. R. FUKUDA y A. ISHIHAMA, J. Mol. Biol., 57, 523-540 (1974)
158. I. ALZ, O. KRATKY y D. RABUSSAY, Eur. J. Biochem., 28, 205-209 (1972)
159. A.M.Q. KING y B.H. NICHOLSON, J. Mol. Biol., 62, 303-319 (1971)
160. J.Y. LeTALHER, M. KERMECI y P. JEANTEUR, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 70, 2911-2915 (1973)
161. H. SCHALLER, C. GRAY y K. HERRMANN, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 72, 737-741 (1975)
162. D. PRIBNOW, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 72, 781-788 (1975)
163. M. SZEKELY, Nature, 256, 365-366 (1975)
164. J.P. DAUSSE, A. SENTENAC y P. FROMAGEOT, Eur. J. Biochem., 57, 569-578 (1975)
165. P.U. GIACOMONI, J.I. LeTALHER y J.B. LePECQ, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 71, 3091-3095 (1974)
166. J.M. SAUCLER y J. WANG, Nature New Biol., 239, 167-170 (1972)
167. S.A. KUMAR y J.S. KRAKOW, J. Biol. Chem., 250, 2878-2884 (1975)
168. J.S. KRAKOW y K. VON DER HELM, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 35, 73-83 (1970)
169. H.R. LILL y G.R. HARTMANN, Eur. J. Biochem., 54, 45-53 (1975)
170. F.Y. WU y L.R. YARBROUGH y C.W. WU, Biochemistry, 15, 3254-3258 (1976)
171. C.W. WU, L.R. YARBROUGH, F.Y.H. WU y Z. HILLEL, Biochemistry, 15, 2097-2104 (1976)

APENDICE

Derivación de la ecuación (4).

Se tiene el siguiente sistema:



en que:

$$(b) \quad K_I^E = \frac{[E][PLP]}{[E \cdot PLP]}$$

$$(c) \quad K_I^{EH} = \frac{[EH^+][PLP]}{[EH^+ \cdot PLP]}$$

$$(d) \quad K_H^E = \frac{[E][H^+]}{[EH^+]}$$

$$(e) \quad K_H^{EI} = \frac{[E \cdot PLP][H^+]}{[EH^+ \cdot PLP]}$$

$$(f) \quad [E_0] = [E] + [EH^+] + [E \cdot PLP] + [EH^+ \cdot PLP]$$

Reemplazando (b), (c), (d) y (e) en (f) se tiene:

$$[E_0] = \frac{K_I^E [E \cdot PLP]}{[PLP]} + \frac{K_I^E [E \cdot PLP] [H^+]}{K_H^E [PLP]} + [E \cdot PLP] + \frac{[E \cdot PLP] [H^+]}{K_H^{EI}}$$

$$[E_0] = [E \cdot PLP] \left\{ \frac{K_I^E}{[PLP]} + \frac{K_I^E [H^+]}{K_H^E [PLP]} + 1 + \frac{[H^+]}{K_H^{EI}} \right\}$$

multiplicando por PLP en ambos miembros

$$[E_0] [PLP] = [E \cdot PLP] \left\{ K_I^E + \frac{K_I^E [H^+]}{K_H^E} + [PLP] + \frac{[H^+] [PLP]}{K_H^{EI}} \right\}$$

$$[E_0] [PLP] = [E \cdot PLP] \left\{ K_I^E \left[1 + \frac{[H^+]}{K_H^E} \right] + [PLP] \left[1 + \frac{[H^+]}{K_H^{EI}} \right] \right\}$$

Reagrupando

$$(g) \quad [E \cdot PLP] = \frac{[E_0] [PLP] \frac{1}{1 + \frac{[H^+]}{K_H^{EI}}}}{K_I^E \left[\frac{1 + \frac{[H^+]}{K_H^E}}{1 + \frac{[H^+]}{K_H^{EI}}} \right] + [PLP]}$$

Si $[PLP]$ es baja,

$$(h) \quad (3) \quad k_{obs} = \frac{k_2}{K_I^E} [PLP]$$

$$\text{y (b) como } K_I^E = \frac{[E][PLP]}{[E \cdot PLP]}$$

$$(i) \quad \therefore k_{obs} = \frac{[E \cdot PLP]}{[E_0]} k_2$$

Reemplazando el valor de (g) en (i), se obtiene:

$$j) \quad k_{obs} = \frac{k_2 [PLP] \left\{ \frac{1}{1 + \frac{[H^+]}{K_H^{EI}}} \right\}}{K_I^E \left[\frac{1 + \frac{[H^+]}{K_H^E}}{1 + \frac{[H^+]}{K_H^{EI}}} \right] + [PLP]}$$

(k) En el caso más sencillo, $K_I^E = K_H^{EI}$

$$l) \quad k_{obs} = \frac{k_2 [PLP]}{K_I^E + [PLP]} \cdot \frac{1}{1 + \frac{[H^+]}{K_H^{EI}}}$$

como

$$(m) \quad k_{obs}^{lim} = \frac{k_2 [PLP]}{K_I^E + [PLP]}$$

siendo k_{obs}^{lim} independiente del pH. Reemplazando (m) en (1) resulta:

$$(n) (4) \quad k_{obs} = k_{obs}^{lim} \frac{K_H^{EI}}{K_H^{EI} + [H^+]}$$