

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**Poliadenilación de los RNAs mensajeros durante el
desarrollo de Artemia**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Leandro Sastre Garzón

DIRECTOR:

Jesús Sebastián Audina

Madrid, 2015

T 575
SAS
pd



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5310055652

LEANDRO SASTRE GARZON

POLIADENILACION DE LOS RNAs MENSAJEROS DURANTE EL DESARROLLO DE Artemia

Director: Jesús Sebastián Audina, Dr en Ciencias Biológicas,
Investigador Científico del CSIC



R. 26.600

Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Ciencias Biológicas
1981

J. Sebastián

Leandro Sastre

Este trabajo ha sido realizado bajo la dirección del Dr. Jesús Sebastián Audina en el Instituto de Enzimología del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

Quiero agradecer a Jesús Sebastián la dirección de la presente Tesis doctoral. Quiero reconocer, en primer lugar, su acogida y su amistad. Durante el desarrollo de esta Tesis estimuló constantemente mi iniciativa sin rehuir en ningún momento la ayuda o el consejo necesario. Su actitud abierta a las innovaciones nos llevó a emplear una gran variedad de técnicas experimentales, con evidente beneficio para mi formación investigadora y profesional.

Al Doctor Angel Martín Municio le agradezco haber aceptado ser ponente de esta Tesis.

He de agradecer, como un factor que representó una gran ayuda para la realización de esta Tesis, el ambiente que me rodeó en el Instituto de Enzimología. La cordialidad y la cooperación que me ofrecieron mis compañeros hicieron grata mi estancia en el Instituto. Debo agradecer especialmente su ayuda a los compañeros de la unidad de Bioquímica de desarrollo y a los compañeros que realizaron la tesis doctoral durante mi estancia en el Instituto. María del Carmen Osuna, Jesús Cruces, Miguel Quintanilla, María Eugenia Gallego, Inmaculada Estepa, Elvira Domínguez, Margarita Fernández y Jaime Renart han compartido conmigo trabajos, contratiempos e ilusiones.

Por último, deseo expresar mi agradecimiento a María del Rosario Perona. Su compañía supuso para mí un gran estímulo, ayudándome a afrontar las dificultades y los pequeños problemas que van surgiendo día a día.

INDICE

Abreviaturas.....	IX
Relación de Esquemas, Tablas y Figuras.....	X
I. INTRODUCCION	1
Poliadenilación del mRNA.....	4
Enzimología de la poliadenilación del mRNA.....	9
El almacenamiento y activación del mRNA en sistemas en desarrollo.....	12
Ciclo biológico y bioquímica del desarrollo de <u>Artemia</u>	19
El almacenamiento de mRNAs en las gastrulas enquistadas de <u>Artemia</u>	24
Objetivos del trabajo.....	28
II. MATERIALES Y METODOS	29
1. Materiales.....	30
1.1. Aparatos.....	30
1.2. Material biológico.....	31
1.3. Productos químicos.....	31
1.4. Tampones.....	32
1.5. Medios de cultivo.....	33
2. Métodos	33
2.1. Tratamiento de los quistes y obtención de poblaciones sincronizadas de embriones y larvas en desarrollo.....	33
2.2. Preparación de resinas para cromatografía.....	35
2.3. Procedimientos de homogeneización y fraccionamiento subcelular.....	37
2.4. Ensayos enziméticos.....	40
2.4.1. Poli(A) polimerasa.....	40
2.4.2. ATPasa.....	41
2.4.3. Fosfatasa alcalina.....	42
2.4.4. RNasa.....	43
2.5. Métodos de separación de nucleótidos.....	43

2.5.1. Métodos cromatográficos.....	43
2.5.2. Métodos de electroforesis de alto voltaje.....	47
2.6. Cálculo de la longitud del segmento de ácido poliadenílico sintetizado por la poli(A) polimerasa.....	49
2.7. Procesos de extracción de RNA.....	50
2.8. Obtención de ³² P-rRNA de levadura.....	53
2.9. Cuantificación del ácido poliadenílico en preparaciones de RNA.....	53
2.10. Valoración de componentes bioquímicos.....	56
2.10.1. Valoración de proteínas.....	56
2.10.2. Valoración de DNA.....	56
2.10.3. Valoración de ácidos nucleicos.....	57
2.11. Técnicas de electroforesis en gel.....	57
2.11.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico.....	57
2.11.2. Electroforesis en gel de agarosa al 1,4 %.....	59
2.12. Obtención de lisados de reticulocitos de conejos.....	60
2.13. Ensayo de traducción <u>in vitro</u> de mRNAs.....	62
III. RESULTADOS	
A. ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES DE LA POLI(A) POLIMERASA DE LA FRACCION SOLUBLE DE EMBRIONES ENQUISTADOS DE ARTEMIA.....	65
1. Purificación del enzima y características del producto de reacción.....	65
1.a. Purificación del enzima.....	65
1.b. Unión del producto de reacción al RNA iniciador.....	70
1.c. Unión covalente del producto de reacción al extremo 3' del RNA iniciador.....	70
2. Características moleculares de la poli(A) polimerasa.....	79
2.a. Peso molecular.....	79

2.b. Punto isoeléctrico.....	80
3. Propiedades cinéticas y de especificidad de la poli(A) polimerasa.....	84
3.a. Variación de la velocidad de reacción con la cantidad de enzima.....	84
3.b. Variación de la actividad enzimática con el tiempo de incubación.....	86
3.c. Especificidad de sustrato de la poli(A) polimerasa.....	90
3.c.1. Especificidad de la poli(A) polimerasa para el nucleótido en posición 3' terminal del RNA iniciador.....	90
3.c.2. Especificidad del enzima para el nucleótido sustrato de la poli(A) polimerasa.....	95
3.d. Efecto de la concentración de nucleótidos sobre la actividad de la poli(A) polimerasa.....	101
3.d.1. Efecto de la concentración de ATP utilizando RNA como iniciador.....	101
3.d.2. Efecto de la concentración de dATP utilizando RNA como iniciador.....	108
3.d.3. Efecto de las concentraciones de ATP utilizando poli(A) como iniciador.....	110
3.d.4. Efecto de la concentración de RNA a dos concentraciones de ATP.....	110
3.e. Algunos estudios sobre el mecanismo de reacción de la poli(A) polimerasa.....	114
3.e.1. Efecto de las variaciones conjuntas de ATP y RNA iniciador sobre la actividad enzimática.....	114
3.e.2. Variación de la longitud de la cadena de ácido poliadenílico con el tiempo de reacción.....	118

B. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD POLI(A) POLIMERASA DURANTE EL DESARROLLO DE ARTEMIA.....	124
1. Variación cuantitativa de la actividad poli(A) polimerasa durante el desarrollo.....	124
2. Estudio de la localización subcelular de la actividad poli(A) polimerasa durante el desarrollo de <u>Artemia</u>	129
3. Estudios comparativos de las poli(A) polimerasas presentes en la fracción soluble y particulada de nauplias de <u>Artemia</u>	133
3.a. Estudio de las propiedades de la actividad poli(A) polimerasa en extractos totales de nauplias.....	133
3.b. Purificación parcial y caracterización de las actividades poli(A) polimerasas presentes en las fracciones particuladas y solubles de nauplias.....	140
3.b.1. Purificación de la poli(A) polimerasa de nauplias.....	140
3.b.2. Caracterización de las enzimas parcialmente purificadas.....	142
3.b.2.a. Especificidad de metal divalente.....	145
3.b.2.b. Especificidad de sustrato.....	145
3.b.2.c. Especificidad de iniciador.....	148
3.b.2.d. Dependencia de la actividad enzimática con la cantidad de enzima.....	150
3.b.2.e. Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática.....	150
3.b.2.f. Longitud de la cadena poliadenílica sintetizada.....	153

C. METABOLISMO DEL ACIDO POLIADENILICO DURANTE EL DESARROLLO	
<u>EMBRIONARIO DE Artemia</u>	
1. Cuantificación y distribución subcelular del ácido poliadenílico en embriones enquistados de <u>Artemia</u>	158
2. Asociación del ácido poliadenílico con proteínas formando complejos ribonucleoproteicos.....	163
3. Variación de la cantidad de ácido poliadenílico y en su localización subcelular durante el desarrollo embrionario.....	167
D. PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LOS COMPLEJOS RIBONUCLEOPROTEICOS QUE CONTIENEN ACIDO POLIADENILICO PRESENTES EN EMBRIONES ENQUISTADOS DE <u>Artemia</u>	
1. Solubilización de los complejos ribonucleoproteicos asociados a la fracción subcelular compuesta por mitocondrias y membranas.....	174
2. Purificación de los complejos ribonucleoproteicos presentes en las fracciones de mitocondrias y membranas y en la fracción postmitocondrial	176
3. Caracterización de los complejos ribonucleoproteicos purificados.....	180
3.a. Determinación de la densidad de flotación en gradientes isopícnicos de sacarosa.....	180
3.b. Caracterización de los componentes proteicos de los complejos.....	182
3.c. Tamaño del RNA poliadenilado asociado con los complejos ribonucleoproteicos.....	188
3.d. Estudio de la capacidad de traducción del RNA presente en los complejos ribonucleoproteicos.....	188
E. POLIADENILACION IN VITRO DE LOS COMPLEJOS RIBONUCLEOPROTEICOS DE EMBRIONES DE <u>Artemia</u>	
1. Efecto de la concentración de complejos sobre la actividad poli(A) polimerasa.....	196

VIII

2. Efecto del tiempo de incubación sobre la actividad poli(A) polimerasa.....	200
3. Longitud de la cadena poliadenílica sintetizada <u>in vitro</u> utilizando los complejos ribonucleoproteicos como iniciadores para la poli(A) polimerasa.....	202
IV. DISCUSION.....	205
V. CONCLUSIONES.....	232
VI. BIBLIOGRAFIA.....	236

ABREVIATURAS

AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albúmina de suero bovino
CM celulosa	Carboxi metil celulosa
CPM	cuentas por minuto
dATP	Deoxiadenosina trifosfato
DEAE celulosa	Dietil amino etil celulosa
DNA	Acido desoxirribonucléico
EDTA	Acido etilendiamino tetracético
EGTA	Acido etilenglicol-bis-(aminoetil eter)-tetracético
HEPES	N,2-hidroxietil piperazina,N,2 etano sulfónico
PEI celulosa	Polietileneimina celulosa
Oligo(dT) celulosa	Acido desoxitimidílico unido a celulosa
poli (A)	Acido poliadenílico
poli (C)	Acido policitidílico
poli (G)	Acido poliguanílico
poli (U)	Acido poliuridílico
poli (AG)	Acido poliadenílico-guanidílico
poli (AU)	Acido poliadenílico-uridílico
poli (CU)	Acido policitidílico-uridílico
poli (GU)	Acido poliguanidílico-uridílico
poli (IC)	Acido poliinosínico-citidílico
poli (A)- poli (U)	Acido poliadenílico-poliuridílico
RNA	Acido ribonucléico
mRNA	Acido ribonucléico mensajero
rRNA	Acido ribonucléico ribosomal
tRNA	Acido ribonucléico de transferencia
RNP	Ribonucleoproteina
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato sódico
STI	Inhibidor de la tripsina de la semilla de soja
TEMED	N,N,N',N' tetrametil etilen diamida
TCA	Acido tricloroacético
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
TMV	Virus del mosaico del tabaco

RELACION DE DIAGRAMAS

Diagrama I: Programa del desarrollo de <u>Artemia</u>	21
---	----

RELACION DE TABLAS

Tabla I. Migración relativa de los nucleósidos 2'-3' monofosfato en placas de PEI-celulosa en cromatografías bidimensionales.....	46
Tabla II. Migración relativa de los nucleósidos 2'-3' monofosfato sometidos a electroforésis de alto voltaje.....	48
Tabla III. Purificación de la poli(A) polimerasa de la fracción soluble de embriones de <u>Artemia</u>	68
Tabla IV. Análisis de la unión covalente de la cadena de poli(A) al RNA iniciador.....	78
Tabla V. Especificidad de la poli(A) polimerasa para el RNA iniciador.....	91
Tabla VI. Especificidad de la poli(A) polimerasa por la base del nucleótido 3' terminal del RNA iniciador.....	94
Tabla VII. Especificidad de sustrato de la poli(A) polimerasa.....	96
Tabla VIII. Efecto de diferentes inhibidores sobre los niveles de actividad poli(A) polimerasa en nauplias de <u>Artemia</u>	128
Tabla IX. Distribución subcelular de la poli(A) polimerasa durante el desarrollo temprano de <u>Artemia</u>	131
Tabla X. Purificación de la actividad poli(A) polimerasa de la fracción particulada de nauplias de <u>Artemia</u>	143
Tabla XI. Purificación de la actividad poli(A) polimerasa de la fracción soluble de nauplias de <u>Artemia</u>	144
Tabla XII. Especificidad de metal de las poli(A) polimerasas de nauplias y embriones de <u>Artemia</u>	146
Tabla XIII. Especificidad de nucleótido de las poli(A) polimerasas de nauplias de <u>Artemia</u>	147
Tabla XIV. Especificidad de RNA iniciador de las poli(A) polimerasas de nauplias de <u>Artemia</u>	149

Tabla XV. Efecto de la concentración de sulfato amónico sobre la relación de actividades de las poli(A) polimerasas de nauplias con RNA y poli(A) como iniciadores.....	151
Tabla XVI. Distribución subcelular de los ácidos nucleicos en embriones enquistados de <u>Artemia</u>	160
Tabla XVII. Variación del contenido en poli(A) durante el desarrollo embrionario de <u>Artemia</u>	168
Tabla XVIII. Distribución subcelular del poli(A) durante el desarrollo embrionario de <u>Artemia</u>	170
Tabla XIX. Solubilización del poli(A) de la fracción de mitocondrias y membranas de embriones enquistados de <u>Artemia</u>	175
Tabla XX. Pesos moleculares de las proteínas asociadas a los complejos ribonucleoproteicos poliadenilados de embriones de <u>Artemia</u>	187
Tabla XXI. Efecto de la concentración de iniciador sobre el periodo de latencia de la poli(A) polimerasa.....	203

RELACION DE FIGURAS

Figura 1. Curva de hibridación del ácido poliadenílico con ácido poliuridílico marcado con tritio.....	55
Figura 2. Cromatografía en Bio-REX de la poli(A) polimerasa de fracciones solubles de embriones enquistados.....	67
Figura 3. Centrifugación zonal en gradientes de sacarosa del producto de reacción de la poli(A) polimerasa utilizando rRNA 18s de levadura como iniciador.....	72
Figura 4. Centrifugación zonal en gradientes de sacarosa del producto de la reacción de la poli(A) polimerasa utilizando rRNA 26, 18 y 5s de levadura como iniciadores.....	74
Figura 5. Cálculo del peso molecular de la poli(A) polimerasa de embriones enquistados por gel filtración.....	81
Figura 6. Determinación del punto isoeléctrico de la poli(A) polimerasa de la fracción soluble de embriones; enquistados.....	83
Figura 7. Efecto de la cantidad de poli(A) polimerasa sobre la velocidad de reacción	85
Figura 8. Relación entre la cantidad de proteína y la actividad de la poli(A) polimerasa.....	87
Figura 9. Cinética de la reacción de la poli(A) polimerasa con respecto al tiempo de incubación.....	88
Figura 10. Inhibición de la incorporación de ATP por dATP y de la incorporación de dATP por ATP.....	97
Figura 11. Análisis del producto de reacción de la poli(A) polimerasa utilizando dATP como sustrato.....	100
Figura 12. Efecto de la concentración de ATP sobre la actividad poli(A) polimerasa.....	102
Figura 13. Representación de Hill de la inhibición por ATP de la actividad poli(A) polimerasa.....	104
Figura 14. Representación de Dixon de la inhibición por ATP de la actividad poli(A) polimerasa.....	105

Figura 15. Caracterización del tipo de inhibición por ATP de la poli(A) polimerasa.....	107
Figura 16. Efecto de la concentración de dATP sobre la actividad poli(A) polimerasa.....	109
Figura 17. Efecto de la concentración de ATP sobre la actividad poli(A) polimerasa utilizando poli(A) como iniciador.....	111
Figura 18. Representación de Hill de la inhibición por ATP utilizando poli(A) como iniciador.....	112
Figura 19. Efecto de la concentración de RNA iniciador sobre la inhibición por ATP.....	113
Figura 20. Efecto de la concentración de ATP y RNA sobre la actividad poli(A) polimerasa.....	117
Figura 21. Efecto del tiempo de incubación sobre la longitud de la cadena poli(A) sintetizada por la poli(A) polimerasa utilizando RNA de <i>Torula</i> como iniciador.....	120
Figura 22. Efecto del tiempo de incubación sobre la longitud de la cadena de poli(A) sintetizada por la poli(A) polimerasa utilizando poli(A) como iniciador.....	122
Figura 23. Niveles de actividad poli(A) polimerasa durante el desarrollo de <i>Artemia</i>	125
Figura 24. Variación de la actividad poli(A) polimerasa de extractos de nauplias en función del pH.....	135
Figura 25. Sensibilidad térmica de la actividad poli(A) polimerasa de extractos de nauplias.....	136
Figura 26. Isoelectroenfoque de la actividad poli(A) polimerasa de extractos de nauplias.....	137
Figura 27. Cromatografía en DEAE celulosa y Bio-Rex 70 de la poli(A) polimerasa de extractos totales de nauplias.....	139
Figura 28. Efecto de la cantidad de enzima sobre la actividad poli(A) polimerasa de nauplias.....	152
Figura 29. Efecto de la concentración de ATP sobre la actividad poli(A) polimerasa de nauplias.....	154

Figura 30. Representación de Hill de la inhibición por ATP de la poli(A) polimerasa de nauplias.....	155
Figura 31. Electroforesis en gel de poliacrilamida de las fracciones subcelulares de embriones enquistados de <u>Artemia</u>	162
Figura 32. Determinación de la densidad de flotación en sacarosa de los complejos poliadenilados presentes en las fracciones subcelulares de embriones enquistados.....	165
Figura 33. Distribución de la actividad poli(A) polimerasa en gradientes isopícnicos de sacarosa de la fracción postmitocondrial.....	166
Figura 34. Cromatografía en oligo(dT)-celulosa del sobrenadante postmitocondrial de embriones enquistados.....	179
Figura 35. Gradientes isopícnicos de sacarosa de los complejos ribonucleoproteicos purificados.....	181
Figura 36. Electroforesis en geles de poliacrilamida de las fracciones de un gradiente isopícnico de sacarosa conteniendo complejos ribonucleoproteicos de la fracción postmitocondrial de embriones enquistados de <u>Artemia</u>	184
Figura 37. Electroforesis en geles de poliacrilamida de las fracciones de un gradiente zonal conteniendo complejos ribonucleoproteicos de las fracciones postmitocondrial y de membranas de embriones enquistados de <u>Artemia</u>	185
Figura 38. Electroforesis en gel de agarosa de los RNAs extraídos de los complejos ribonucleoproteicos.....	189
Figura 39. Traducción <u>in vitro</u> del mRNA de embriones enquistados y nauplias de <u>Artemia</u>	191
Figura 40. Efecto de la concentración de ClK en la traducción del mRNA de embriones enquistados y nauplias de <u>Artemia</u>	193
Figura 41. Traducción <u>in vitro</u> de los RNAs extraídos de partículas de ribonucleoproteínas de embriones enquistados de <u>Artemia</u>	195

Figura 42. Dependencia de la actividad poli(A) polimerasa de la concentración de partículas ribonucleoproteicas.....	197
Figura 43. Dependencia de la actividad poli(A) polimerasa de la concentración de RNA extraído de las partículas ribonucleoproteicas.....	199
Figura 44. Dependencia del tiempo de ensayo de la poliadenilación de las partículas ribonucleoproteicas y del RNA extraído de las mismas.....	201

I. INTRODUCCION

La regulación de la expresión de la información genética es uno de los problemas biológicos que despiertan actualmente mayor interés.

Existen diversos procesos por los que se determinan las proteínas que se sintetizan en un momento determinado en la célula. El primer proceso es la síntesis del RNA mensajero, cuya naturaleza se puede regular por diferentes mecanismos. Otros procesos en los que se puede realizar un control de la expresión génica son los procesos de modificación post-transcripcional de los RNAs mensajeros, los de síntesis proteica o los procesos de modificación de las proteínas que se sintetizan. Todas estas etapas determinan el producto final de la expresión génica, las proteínas funcionales que existen en cada momento en la célula.

Desde que Jacob y Monod propusieron en 1961 el concepto de RNA mensajero, se han hecho grandes avances en la identificación y caracterización de estas moléculas. Los RNAs mensajeros se sintetizan como una copia del DNA y posteriormente sufren una serie de modificaciones que conforman su estructura final (ver revisiones de Brawerman, 1976; Revel y Groner, 1978; Rottman, 1978; Adams, 1979; Karpetsky, 1979). Estas modificaciones son de cuatro tipos:

a) Adición de una cadena de ácido poliadenílico en el extremo 3' terminal, modificación descrita por Brawerman en 1963.

b) Metilación de bases internas de la cadena polinucleotídica del mRNA, descrita por Perry y Kelly en 1974.

c) Adición de una molécula de GTP unida a la base en posición 5' terminal del mRNA (Ro-Choi, 1975). La molécula de GTP está unida a través de un enlace 5' -5' trifosfato. Posteriormente se metilan las bases que forman parte de esta estructura.

d) Existe una sólida evidencia experimental que indica que el mRNA es sintetizado en forma de un precursor de alto peso molecular, llamado RNA heterogeneo nuclear (hnRNA). La relación entre el hnRNA y el mRNA se ha establecido en base a una serie de estudios de hibridación y cinéticos que han sido revisados por Perry y col. en 1976. Posteriormente se ha demostrado que la conversión del hnRNA en mRNA se lleva a cabo mediante la supresión de segmentos internos del hnRNA. Los segmentos eliminados se hallan generalmente intercalados entre segmentos que codifican para la secuencia de las proteínas. Este fenómeno, que da lugar a una reorganización de las secuencias del RNA, fué descrito inicialmente por Berger y col. en 1977 y por Aloni y col. en 1977, habiendo sido revisado recientemente por Abelson (1979).

Todos estos datos han permitido conocer que el mRNA sufre una serie de modificaciones desde que se sintetiza en el núcleo hasta que dirige la síntesis proteica en los polisomas. Estas modificaciones constituyen el procesamiento del mRNA, que es un proceso múltiple y tiene lugar tanto en el núcleo como en el citoplasma.

La existencia de estas modificaciones en la estructura del mRNA hace que existan muchas más posibilidades de control del flujo genético de las que permitía suponer el modelo de Jacob y Monod. Las posibilidades de regulación durante las etapas del procesamiento del mRNA son de dos tipos:

- 1) El mensaje genético que porta un mRNA depende de la secuencia de bases del DNA que sirvió de molde para su síntesis y de las secuencias internas que hayan sido eliminadas durante su procesamiento. La eliminación de segmentos internos del mRNA es un proceso hidrolítico extraordinariamente específico. Las posibilidades de regulación del mensaje genético en esta etapa llegan al extremo de poder originarse dos mRNAs diferentes a partir de un único producto de transcripción (Berk y Sharp, 1978; Early y col., 1980).

2) El número de especies diferentes de mRNA existentes en el núcleo es mucho mayor que el de especies polisomales (Davidson y Britten, 1979; Lev y col., 1980) como consecuencia de que las células transcriben un número de especies de mRNA mayor que el que utilizan para dar lugar a síntesis de proteínas. Este hecho tiene como consecuencia el que exista una selección de los mRNAs que van a ser traducidos entre un exceso de mRNAs (Strain y col., 1977; Levy y col., 1980). Esta selección parece ocurrir durante el procesamiento del mRNA. En otras ocasiones, los mRNAs son sintetizados por la célula en un período de tiempo anterior a su utilización, quedando almacenados en el citoplasma (Chau, 1976; Civelli y col., 1976). En estos casos el almacenamiento del mRNA también parece depender de su procesamiento.

Todos estos datos apuntan hacia la gran importancia de las etapas de procesamiento de los mRNAs en la regulación de la actividad génica.

POLIADENILACION DEL mRNA

En esta tesis doctoral se ha abordado el estudio de una de las etapas más generales del procesamiento de los mRNAs: el proceso de poliadenilación. Este tema se ha tratado desde un punto de vista doble: la enzimología de la poliadenilación y el metabolismo de las cadenas de ácido poliadenílico unidas al mRNA durante el desarrollo embrionario y larvario temprano de Artemia.

La existencia de una cadena poliadenílica en los mRNAs fué descrita en primer lugar por Brawerman en 1963 en hígado de rata. Posteriormente se ha descrito su existencia en muchos otros sistemas (ver revisiones de Brawerman, 1976; Rottman, 1978), siendo una pieza fundamental en el estudio de los mRNAs al permitir su purificación por cromatografía de afinidad.

No todos los mRNAs están poliadenilados. Milcarek y col. (1974) demostraron que aproximadamente el 70% del mRNA citoplásmico está poliadenilado, mientras que el otro 30% no lo está. No se conoce aún con exactitud si estas dos poblaciones de mRNAs contienen secuencias de mRNA totalmente diferentes. Se han descrito mRNAs que sólo existen en forma no poliadenilada o con cadenas poliadenílicas muy cortas, como el que codifica para histonas (Adesnik y Darnell, 1972; Greemberg y Perry, 1972). Otros mRNAs pueden presentarse simultáneamente en formas poliadeniladas y no poliadeniladas, como es el caso del mRNA de la caseína (Houdebine, 1976).

La longitud del segmento poliadenílico es muy variable, habiéndose descrito segmentos de 19-34 residuos en mRNA de insectos (Vournakis y col., 1974) y de 20-60 residuos en levadura (Groner y col., 1974). En eucariotes superiores el tamaño medio se ha estimado en 130-150 residuos (Jeffery y Brawerman, 1974). Se ha descrito la existencia de tres poblaciones del mRNA de la globina que difieren en la longitud de su segmento poliadenílico (Groski, 1974) y de dos poblaciones de mRNA con diferente longitud de la cadena poliadenílica en oocitos de Xenopus-laevis (Cabada y col., 1977). Estas dos poblaciones se acumulan de forma diferencial durante la oogénesis, representando probablemente poblaciones de mRNA que tienen diferente regulación metabólica.

Se ha demostrado que la cadena poliadenílica se sintetiza en el núcleo en un proceso postranscripcional (Weimberg, 1973), de forma que el RNA heterogéneo nuclear está poliadenilado en un 20% de sus moléculas (Lewin, 1975). La longitud de la cadena poliadenílica presente en el hnRNA ha sido estimada en 200 nucleótidos (Mendecki y col., 1972). La

síntesis de ácido poliadenílico parece ser una de las primeras etapas en el procesamiento de los hnRNAs. En el RNA de la cadena ligera de las Inmunoglobulinas en células MPE-11 se ha observado la presencia de la cadena poliadenílica en precursores de gran tamaño del mRNA, así como en moléculas de tamaño intermedio, y en el mRNA maduro (Schibler y col., 1978). Igual fenómeno se ha descrito en el mRNA de Adeno 2 (Nevins y Darnell, 1978).

Además de los procesos nucleares de síntesis de la cadena poliadenílica, existen procesos citoplásmicos de renovación de la cadena (Brawerman y Diez, 1975).

Aunque se tiene conocimientos detallados de la estructura y metabolismo de los segmentos poliadenílicos presentes en los extremos 3' de mRNAs y hnRNAs, aún no se conoce la función de esta estructura. Se la ha implicado en el control de tres tipos de procesos: el proceso de traducción, el paso del mRNA del núcleo al citoplasma y el control de la vida media del mRNA. En cualquier caso, hemos de recordar que no todo el mRNA está poliadenilado, por lo tanto el segmento poliadenílico sólo puede desempeñar una función en el metabolismo de los mRNAs poliadenilados, función que en los no adenilados se debe regular por otros mecanismos.

Diversos experimentos han demostrado que la supresión de la cadena poliadenílica de un mRNA poliadenilado no disminuye significativamente su capacidad de traducción, ni en síntesis protéica libres de células (Williamson y col., 1974; Soreq y col., 1974), ni cuando se inyectan los mRNAs en oocitos de Xenopus laevis (Huez y col., 1974; Deshpande y col., 1979). Sin embargo, la estabilidad del mRNA puede ser dependiente de la presencia de la cadena de poli(A).

La estabilidad del mRNA de la globulina inyectado en oocitos de Xenopus laevis es menor para el mRNA deadenilado que para el que posee cadena poliadenílica (Huez y col., 1974; Marbaix y col., 1975) y la estabilidad del mRNA se restablece cuando se vuelve a poliadenilar el mRNA deadenilado (Huez y col., 1975). Previamente se había observado un progresivo acortamiento del segmento poliadenílico con la edad de los mRNAs citoplásmicos (Brawerman, 1973). Estos trabajos dieron base a una hipótesis según la cual el segmento poliadenílico impediría la degradación del mRNA. La longitud del segmento poliadenílico disminuiría desde su paso del núcleo al citoplasma, hasta llegar a un cierto tamaño crítico, momento en que el mRNA portador sería degradado. Esta hipótesis, en cambio, no justifica la similitud de la cadena poliadenílica de los mRNAs de sistemas muy diferentes entre sí, alguno de los cuales se caracteriza por la estabilidad de sus mRNAs y otros por su corta vida media. La realización de experimentos similares a los descritos de inyección en oocitos de Xenopus de mRNAs de otros sistemas, como son Dictyostelium discoideum, virus de la somatitis vesicular y mRNA de α_2 -globulina de hígado de rata, han demostrado, por una parte, una estabilidad muy variada para estos mRNAs y por otra, que los mRNAs poliadenilados y deadenilados tienen la misma estabilidad en el oocito (Allende y col., 1974; Perry y Kelly, 1973; Sheiness y col., 1975; Deshpande y col., 1979).

También se ha descartado un papel regulador del segmento poliadenílico en el paso del mRNA del núcleo al citoplasma, puesto que se ha demostrado que sólo una parte del hnRNA poliadenilado pasa al citoplasma, lo cual descarta la hipótesis de que la poliadenilación sea por sí misma un mecanismo para seleccionar los RNAs que son transportados al citoplasma para su traducción (Getz y col., 1975; Herman y col., 1976; Levy y McCarthy, 1976).

Otro grupo de hipótesis acerca de la función del segmento poliadenílico considera que éste desarrolla su cometido por ser el punto de unión del mRNA con otros componentes celulares, facilitando una labor reguladora de estos últimos sobre el mRNA. Estas hipótesis se apoyan en las peculiaridades estructurales del segmento poliadenílico (revisadas por Karpetsky y col. en 1979) y su influencia sobre la propia estructura del mRNA (Brentani y col., 1979). Asimismo, se ha descrito que el segmento poliadenílico puede estar implicado en la unión del mRNA a membranas (Cardelli y col., 1976).

El tipo más importante de interacciones que mantiene el mRNA con otros componentes es su asociación con proteínas, formando complejos ribonucleoproteicos (revisión de Spirin, 1979). Se ha descrito la asociación específica del segmento poliadenílico con dos proteínas características, de pesos moleculares 52.000 y 76.000. La presencia de estos dos componentes en los complejos que forma el mRNA con las proteínas parece estar limitada al mRNA que está asociado con polisomas, tomando parte activa en el proceso de traducción.

Una de las causas por la que probablemente todavía no se conozca la función del segmento poliadenílico es que la mayor parte de los estudios se ha efectuado con mRNA aislado. Si el segmento poliadenílico tiene alguna función reguladora, sólo podrá ser evidente cuando se estudie el comportamiento del mRNA en su entorno, acompañado con proteínas y en una serie de circunstancias que pueden ser determinantes de su comportamiento. Esta parece ser la tendencia de los estudios que se están realizando en la actualidad. La variación de las condiciones experimentales en el estudio de la función del mRNA puede ser, igualmente, la causa de la gran existencia de muchas contradicciones entre los resultados de diversos autores, tal como hemos tratado de exponer.

ENZIMOLOGIA DE LA POLIADENILACION DEL mRNA

La enzimología del proceso de poliadenilación es, junto con la del proceso de metilación y formación del dinucleósido trifosfato 5' terminal, relativamente bien conocida. La enzimología de las otras etapas del procesamiento, tales como la reorganización de la secuencia, no ha podido ser abordada, salvo en muy pocos casos, debido a la falta de sustratos disponibles para el estudio de los enzimas implicados.

La reacción de síntesis de la cadena poliadenílica reúne dos características importantes: precisa de un RNA con el extremo 3' libre al que se une la cadena poliadenílica (iniciador) y es muy específica para nucleótidos de adenosina como sustrato (no existen otros nucleótidos que no sean AMP en las cadenas poliadenílicas).

Esta reacción parece estar catalizada por un enzima, llamado poli(A) polimerasa, que corresponde a una ATP:RNA terminal riboadenilato transferasa (EC 2.7.7.19). El primer enzima con esta actividad fué descrito por Edmonds y Abrams en 1960. Es un enzima que utiliza ATP como sustrato y es capaz de sintetizar una cadena poliadenílica unida al extremo 3' terminal de un RNA que actúa como iniciador de la cadena. Estos enzimas requieren la presencia en el medio de un catión divalente, generalmente Magnesio o Manganeso. Existe una amplia revisión de las poli(A) polimerasas publicada por Edmonds y Winters en 1976.

A partir de 1960 se ha descrito la existencia de poli(A) polimerasas en numerosos sistemas biológicos. En algunos sistemas se ha descrito la existencia de poli(A) polimerasas nucleares y citoplásmicas, existiendo aparentemente diferentes isoenzimas en estas dos fracciones subcelulares (Man y

Stein, 1974; Coleman y col., 1974; Haff y Keller, 1975; Nevins y Joklik, 1977). En el núcleo, a su vez, se han descrito en algunos sistemas dos poli(A) polimerasas, una localizada en el nucleoplasma y la otra asociada a la cromatina (Jacob y col., 1976; Rose y col., 1977a; Rose y col., 1977b). También se ha descrito la existencia de poli(A) polimerasa unida a polisomas (Blobel, 1973; Kumar y Pederson, 1975; Mazur y Schweiger, 1978; Wilkie y Smellie, 1968).

En resumen, la amplia distribución de la poli(A) polimerasa podría dar cuenta de la síntesis del segmento poliadenílico del mRNA por este enzima en todos los sistemas en las que el ácido poliadenílico se ha descrito. Asimismo, podría dar cuenta tanto del proceso de síntesis nuclear como del proceso de elongación citoplásmica de la cadena poliadenilica.

En la actualidad, existen pruebas indirectas que indican que la poli(A) polimerasa es el enzima responsable de la síntesis de la cadena poliadenilica en las células. Se ha descrito que la cordicepina (2' deoxiadenosina) inhibe in vivo los procesos nucleares de poliadenilación, pero no los citoplásmicos (Penman y col., 1970; Darnell y col., 1971; Mendecki y col., 1972; Diez y Brawerman, 1974). Estudios de inhibición in vitro de las poli(A) polimerasas citosólica y nuclear de hígado de rata por 2' deoxiadenosina trifosfato han demostrado que el enzima unido a cromatina se inhibe por este nucleótido a concentraciones 100 veces inferiores a las necesarias para inhibir el enzima soluble (Rose y col., 1977b), demostrando así una buena correlación entre las características de la poliadenilación in vivo y las de la poli(A) polimerasa estudiada in vitro.

Los estudios de caracterización realizados han permitido la separación cromatográfica de varios isoenzimas en algunos sistemas. Se han descrito tres isoenzimas poli(A) polimerasa en levadura (Haff y Keller, 1973, 1975), tres en núcleos de hígado de rata (Niessing y Sekeris, 1974; Niessing, 1975), tres en células HeLa infectadas con virus vaccinia (Nevins y Joklik, 1977), tres en fibroblastos de embrión de Hamster (Pellicer y col., 1975) y dos en células de tumor ascítico de Ehrlich (Avramova y col., 1980).

En varios sistemas se ha purificado la poli(A) polimerasa prácticamente hasta homogeneidad: en timo de ternera (Winters y Edmonds, 1973 a y b); células de tumor de Krebs (Giron y Hupper, 1972 a y b); células HeLa (Mans y Stein, 1974) y núcleos de hígado de rata (Rose y Jacob, 1976).

Por lo general todas las poli(A) polimerasas descritas son enzimas altamente específicas para el nucleósido trifosfato, de forma que sólo utilizan ATP, teniendo menos de un 5% de actividad con otros ribonucleósidos trifosfato. En algunos sistemas se ha descrito que el enzima es capaz de incorporar dATP con una actividad entre el 10 y el 20% de la que presenta con ATP (Rose y col., 1975; Niessing, 1975). Los isoenzimas de núcleo de levadura incorporan también CTP con un 15% de la actividad que presentan con ATP (Niessing y Sekeris, 1974).

Un parámetro que ha servido en algunas ocasiones para diferenciar los isoenzimas de la poli(A) polimerasa ha sido su capacidad para utilizar diferentes RNAs como iniciadores, así como su capacidad para actuar en presencia de distintos cationes divalentes. Las mayores diferencias observadas radican en que algunas poli(A) polimerasas tienen mayor actividad con RNAs heterogéneos y otras con ácido riboadenílico. Del mismo modo, unas tienen mayor actividad en presencia de Manganeso y otras de Magnesio.

La diferente capacidad de los diversos isoenzimas para utilizar RNA o poli(A) como iniciadores ha llevado a postular la existencia de dos tipos de isoenzimas. Uno de ellos sería responsable de la síntesis de la cadena poliadenílica original sobre el RNA recién transcrito y actuaría preferentemente sobre RNA, mientras que el segundo tipo sería responsable de la posterior elongación de la cadena poliadenílica, actuando preferentemente sobre poli(A). En sistemas donde no se ha encontrado más de un isoenzima, éste podría desempeñar las dos funciones, actuando con RNA y poli(A) como iniciadores.

La longitud de la cadena sintetizada in vitro por las poli(A) polimerasas suele ser corta, 10 a 60 nucleótidos en incubaciones de una hora. Sin embargo, en incubaciones de núcleos aislados se ha obtenido cadena de 200 nucleótidos de longitud (Jelinek, 1974), indicando que la escasa longitud obtenida in vitro debe corresponder a deficiencias en las condiciones experimentales de ensayo.

Por último, puede señalarse que la poli(A) polimerasa parece sufrir una activación mediada por la fosforilación del enzima (Rose y Jacob, 1979 a).

EL ALMACENAMIENTO Y ACTIVACION DEL mRNA EN SISTEMAS EN DESARROLLO

Entre los sistemas en los que la regulación génica a nivel de procesamiento del mRNA tiene mayor importancia se encuentran los sistemas embrionarios. Los oocitos contienen en general mRNA almacenado inactivo, que se activa tras la fecundación y es traducido por el embrión. Este mRNA almacenado es utilizado en la síntesis de proteínas que tiene lugar en el embrión en los estadios tempranos de su desarrollo (Davidson, 1976).

Existen múltiples evidencias experimentales que demuestran la existencia de mRNA almacenado en oocitos y su utilización durante la embriogénesis. Esta experiencia experimental se basa en tres tipos de resultados:

1) Oocitos enucleados de oocitos de erizo de mar presentan una activa síntesis proteica al ser inducidos, sin que exista síntesis simultánea de mRNA (Brachet y col., 1963; Denny y Tyler, 1964).

2) La presencia de Actinomicina D no inhibe la síntesis proteica en las primeras etapas del desarrollo del erizo de mar (Gross y Cousineau, 1964; Greenhouse y col., 1971; Sargent y Raff, 1976).

3) Se ha purificado mRNA de oocitos de erizo de mar, el cual es activo en procesos de traducción in vitro (Jenkins y col., 1973; Gros y col., 1973).

El mRNA acumulado en oocitos se encuentra asociado a proteínas, formando complejos ribonucleoproteicos, según se ha descrito en erizo de mar (Infante y Nemer, 1968; Gros y col., 1973; Kaumeyer y col., 1978), Drosophila (Lovett y Goldstein, 1977) y semillas de trigo (Ajtkozhin y col., 1976). Estas partículas ribonucleoproteicas se caracterizan por estar libres, no asociadas a ribosomas, como lo indica el hecho de que se obtengan separadas de los ribosomas en medios con magnesio. Sus características de tamaño y densidad de flotación son similares a las de partículas ribonucleoproteicas citoplásmicas libres aisladas de otros sistemas.

La iniciación del desarrollo del oocito fecundado es acompañado de un incremento de la síntesis de proteínas,

que en sus primeras etapas está dirigida, como se ha señalado, por el mRNA almacenado. No se conoce exactamente hasta qué etapa del desarrollo existe mRNA materno en el embrión. Tampoco se conoce si todo el mRNA materno comienza a ser traducido tras la fecundación o si algunas especies son traducidas en etapas posteriores del desarrollo.

En este sentido, se ha demostrado la presencia de mRNA de origen materno para la histona H1 hasta la fase inicial de la gastrulación en anfibios (Woodland y col., 1979). Por otra parte, la síntesis de mRNA en el embrión comienza en la fase de blástula media en anfibios (Bachvorava y Davidson, 1966; Bachvorava y col., 1966; Gurdon y Woodland, 1969; Woodland y col., 1979) y a las 5 horas de la fertilización en *Drosophila* (Sawicki y MacIntyre, 1978).

Se han realizado diversos estudios con el fin de conocer si el mRNA almacenado representa una población de mRNAs específicos del oocito. Este problema se ha abordado comparando los mRNAs presentes en oocitos, embriones en desarrollo y tejidos diferenciados. Algunos de estos estudios comparativos se han basado en experimentos de hibridación de los mRNAs con sus DNAs complementarios (cDNA). La proporción de mRNA de un estadio del desarrollo que hibrida con el cDNA de los mRNAs de otro estadio diferente indica cual es el grado de similitud de las dos poblaciones de mRNAs. Los resultados de estos estudios han mostrado que el mRNA almacenado es muy heterogéneo, comprendiendo la mayoría de los mRNAs presentes en células diferenciadas y embrionarias. Las células diferenciadas y embrionarias, en cambio, no poseen todos los mRNAs presentes en oocitos. Estos estudios son equivalentes cuando se realizan con mRNA total o con el obtenido a partir de polisomas (Goldstein, 1978; Perlman y Rosbash, 1978; Galau y col., 1976; Kleene y col., 1977).

Otro método utilizado en estos estudios ha sido la comparación de las proteínas sintetizadas in vitro a partir de las diferentes poblaciones de mRNAs. Las conclusiones generales son las mismas que hemos enunciado anteriormente. Recientemente, reduciendo el número de proteínas objeto de la comparación a un número relativamente pequeño (100-300), se ha podido reconocer a tres proteínas cuyos mRNAs están presentes en el mRNA almacenado en oocitos de Drosophila y no lo están en el mRNA de embriones; se ha podido demostrar que estos mRNAs específicos se incorporan en polisomas para ser traducidos inmediatamente tras la fecundación del oocito (Mermod y col., 1980).

Un tercer método de comparar poblaciones de mRNA consiste en clonar el DNA del organismo. De esta manera se obtienen centenares de clones, conteniendo cada uno de ellos un fragmento diferente del DNA del organismo. El grado de homología entre dos poblaciones de mRNAs se pone de manifiesto por los clones con cuyo DNA hibriden cada una de las poblaciones de mRNA. Con este método se han comparado las poblaciones de mRNAs de oocitos y embriones de distinto estadio de desarrollo. Este tipo de estudios han permitido encontrar variaciones en el nivel de determinadas clases de mRNAs entre los mRNAs acumulados en oocitos de erizo de mar y el mRNA polisomal de los embriones (Davidson y col., 1980).

La conclusión general de todos los trabajos indicados es que el mRNA acumulado en oocitos es muy heterogéneo y contiene gran cantidad de especies de mRNAs, la mayor parte de las cuales se conservan en embriones de distintas edades y en células diferenciadas. Recientemente están surgiendo pruebas de la existencia de algunos mRNAs específicos del oocito, cuya función se desconoce. Hay que hacer la salvedad de que todos estos estudios se realizan con mRNA poliadenilado, no se conoce cuál es la naturaleza del mRNA no poliadenilado que también se halla almacenado en los oocitos y embriones.

Los mecanismos por los cuales se activa la síntesis proteica durante la embriogénesis son desconocidos. Se han realizado muchos estudios con el objeto de conocer por qué no existe síntesis proteica en los oocitos, siendo así que existe mRNA y ribosomas. Los estudios clásicos, realizados en anfibios, indican que el sistema de traducción es totalmente funcional en el oocito sin inducir, puesto que es capaz de traducir mRNAs introducidos en el oocito con gran eficacia (Gurdon y col., 1971). Este dato apunta a que el mecanismo por el cual se inhibe la síntesis de proteínas es a través de una inactivación temporal del mRNA.

La inactivación del mRNA parece estar mediada por su asociación específica con proteínas en diversos sistemas, por cuanto los complejos ribonucleoproteicos no pueden ser traducidos in vitro, mientras que los mRNAs aislados de estos complejos dan lugar a un activo proceso de traducción (Kaumeyer y col., 1978; Raff, 1979).

Los complejos ribonucleoproteicos de erizo de mar únicamente dirigen la síntesis proteica in vitro cuando se aíslan en condiciones de alta concentración de iones Na, o cuando la traducción in vitro se realiza en presencia de 12 mM de Cl_2Mg , datos que indican que es necesaria la disociación de alguna de las proteínas para que el mRNA se puede traducir (Ilan y Ilan, 1978; Jenkins y col., 1978).

El posible papel de los componentes proteicos de los complejos ribonucleoproteicos como silenciadores del mRNA parece apoyado por el hecho de que los componentes proteicos de los complejos libres (informosomas) y los unidos a polisomas difieren marcadamente (ver revisión de Spirin, 1979).

Uno de los posibles mecanismos de activación de los mRNAs podría ser la variación de los componentes proteicos que acompañan al mRNA almacenado y su sustitución por los componentes característicos de los complejos ribonucleoproteicos de polisomas. En esta hipótesis queda de nuevo el interrogante de la naturaleza del mecanismo de esta sustitución.

Otros posibles mecanismos de activación de los mRNAs pueden basarse en variaciones estructurales del propio mRNA durante la fase de activación del desarrollo. De esta manera la estructura del mRNA del oocito podría tener alguna propiedad que le hiciera ineficaz para su traducción, siendo convertido en mRNA funcional durante el proceso de activación. La mayoría de los mRNA almacenados presentan las modificaciones propias de mRNAs procesados. Se ha encontrado que el extremo 5' de los mRNAs almacenados presenta el dinucleósido 5'-5' trifosfato presente en los mRNAs eucarióticos (Hickey y col., 1976) y que están poliadenilados en un porcentaje importante de sus moléculas, porcentaje que es del 50% para oocitos de anfibio (Ruderman y Pardue, 1976).

Un fenómeno relativamente bien estudiado de modificación estructural del mRNA durante la activación en los sistemas embrionarios es el aumento de la cantidad de ácido poliadenílico unido a mRNA. Se ha descrito un aumento de dos veces en la cantidad de poli(A) durante la primera división celular tras la fertilización en el erizo de mar (Wilt, 1973; Slater y col., 1972). Esta poliadenilación consiste principalmente en un proceso de elongación de cadenas poliadenílicas preexistentes (Slater y col., 1973; Slater y Slater, 1974; Dolecki y col., 1977; Wilt, 1977; Brandhorst y Bannet, 1978), siendo dependiente de la síntesis de proteínas, pero no de la de RNA (Slater y col., 1974).

En la activación de los oocitos de anfibios se ha observado el mismo fenómeno de aumento en la cantidad de ácido poliadenílico unido al mRNA preexistente (Rosbash y Ford, 1974; Sagata y col., 1980). Dicho aumento ha sido observado también en otros sistemas, tales como la estrella de mar (Jeffery, 1977) y algodón (Harris y Dure, 1978).

No está clara cuál es la función de este proceso de poliadenilación. Los estudios realizados se basan en el efecto de la cordicepina, que inhibe específicamente el proceso de poliadenilación durante las primeras etapas del desarrollo embrionario. Los resultados obtenidos indican que la supresión de la poliadenilación no impide totalmente la activación del proceso de síntesis proteica en erizo de mar (Mescher y Hampreys, 1974) ni en semillas de algodón (Hammet y Katterman, 1975) y trigo (Spiegel y Marcus, 1975), aunque la ausencia de poliadenilación impide la expresión de una proteína concreta codificada por el mRNA acumulado en semillas de algodón (Walbot y col., 1974).

El posible papel del proceso de poliadenilación en la activación del mRNA almacenado parece reforzarse por otra línea de estudios, que han demostrado la relación antigénica entre la poli(A) polimerasa del hepatoma de rata de Morris y una proteína de peso molecular 75.000 presente en los complejos ribonucleoproteicos presente en polisomas (Rose y Jacob, 1979 b), pero que no está presente en los complejos ribonucleoproteicos citoplásmicos que son inactivos en traducción (Venrooij y col., 1977). Estos datos apuntan hacia la posibilidad de que la unión de la poli(A) polimerasa a los complejos ribonucleoproteicos almacenados sea una de los hechos que acompañan y quizás determinan su activación.

CICLO BIOLÓGICO Y BIOQUÍMICA DEL DESARROLLO DE ARTEMIA

El sistema biológico empleado en el estudio que se describe en la presente Tesis es de la clase Branchipoda, orden Anostraca, Artemia sp. Es un pequeño crustáceo (el adulto mide 15 mm de longitud) habitante de medios acuosos de elevada salinidad, tales como estuarios, lagos salados o salinas. Su distribución es muy amplia, habiéndose descrito especies en Europa, Asia, Africa y América.

El género Artemia ha sido estudiado desde un punto de vista morfológico y genético principalmente por dos autores, Artrom (entre 1900 y 1930) y Barigozzi (desde 1935 hasta la actualidad). Estos estudios han sido resumidos por el propio Barigozzi en 1974. Existen dos tipos de poblaciones en Artemia, unas bisexuales y otras partenogénicas. Entre las partenogénicas se encuentran a su vez diploides, tetraploides y octaploides. Se han descrito al menos tres especies diferentes dentro del género Artemia que han perdido la capacidad de tener reproducción cruzada. Toda esta información ha conducido a que la clasificación taxonómica del género Artemia sea un tema que está siendo objeto de estudio en la actualidad.

Artemia ha sido elegido como un sistema modelo para el estudio del desarrollo embrionario en virtud de su ciclo biológico. En las poblaciones bisexuales la fecundación es interna. El huevo fecundado comienza su desarrollo embrionario en el interior de unas bolsas u ovisacos existentes en el abdomen de la hembra. El desarrollo embrionario puede seguir dos vías alternativas, en unos casos el embrión continúa su desarrollo en el ovisaco hasta transformarse en una larva nadadora o nauplia que es expulsada al medio externo. En otros casos, el embrión al llegar a la fase de

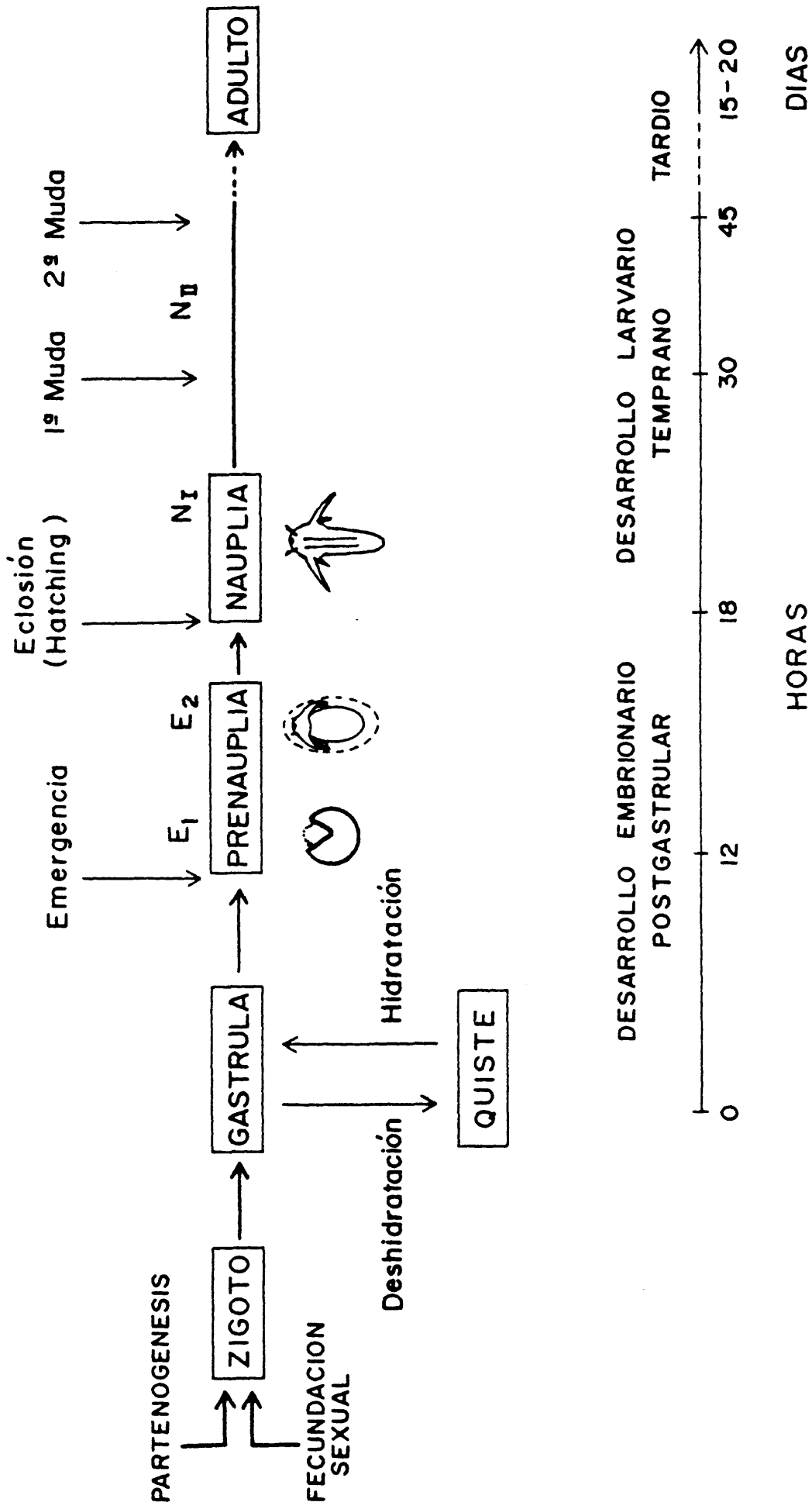
gástrula, se rodea de una cubierta quitinosa o corión, siendo expulsado del ovisaco al exterior. El embrión enquistado sufre un proceso de desecación y entra en una fase de criptobiosis, durante la cual suspende sus funciones metabólicas, pero conserva su viabilidad durante años. Cuando el embrión enquistado se encuentra en un medio acuoso con oxigenación suficiente, a una temperatura entre 20 y 30°C, se hidrata y continúa su desarrollo embrionario. Al cabo de un tiempo el embrión rompe la cubierta coriónica y da lugar a un embrión transparente, que aún está rodeado de una fina membrana; esta fase recibe el nombre de emergencia. Poco después de la emergencia el embrión elimina también la cubierta transparente, originándose una larva nadadora o nauplia; es el proceso de eclosión. Esta nauplia es totalmente análoga a la que sale del oviducto materno en el otro proceso de desarrollo descrito.

La nauplia continúa su desarrollo a través de una serie de mudas, que continúan en el animal adulto. El ciclo completo se resume en el diagrama adjunto.

La ventaja experimental de este ciclo biológico radica en que los embriones criptobióticos, llamados habitualmente quistes, son disponibles comercialmente, pudiéndose inducir su desarrollo embrionario en el laboratorio (Ditrieu, 1960). El desarrollo de métodos para separar las nauplias de los quistes permite, por otra parte, la obtención de poblaciones de nauplias sincronizadas en su desarrollo larvario. De esta forma, es posible estudiar la secuencia temporal de sucesos que tienen lugar durante el desarrollo temprano de Artemia.

En las condiciones experimentales que hemos utilizado, la emergencia tiene lugar entre las 14 y 16 horas, la eclosión entre las 16 y las 18, y la primera muda hacia las 40 horas.

PROGRAMA DEL DESARROLLO DE Artemia salina



En el proceso de inducción del desarrollo de los quistes hay que distinguir dos procesos distintos, el primero es el proceso de activación metabólica de un sistema que pasa de la criptobiosis al estado activo. El segundo proceso es la continuación del desarrollo embrionario desde la fase de gástrula en la que se encuentra el quiste.

Como ejemplo de activación metabólica podemos mencionar la inducción de la respiración en los quistes cuando estos se hidratan (Schmitt y col., 1973; Vallejo y col., 1979). La inducción de la respiración, medida por el consumo de oxígeno de los quistes, es un proceso muy rápido, ocurriendo en las dos primeras horas tras la hidratación de los quistes.

El proceso de desarrollo embrionario se manifiesta en una serie de cambios muy importantes, tanto morfológicos como bioquímicos. Una propiedad importante del desarrollo embrionario del quiste es que hasta la fase de eclosión de la nauplia el desarrollo embrionario tiene lugar sin que haya proliferación celular (Nakanishi y col., 1962; Olson y Clegg, 1978). Este hecho permite en este sistema el estudio diferencial de los procesos de diferenciación celular (muy intensos durante este período de desarrollo) y los de proliferación celular, que son simultáneos en la mayor parte de los sistemas modelos en los que se ha estudiado el desarrollo embrionario.

El desarrollo embrionario postgastrular de Artemia ha sido objeto de diversos estudios bioquímicos. Algunos de estos estudios han tenido como objetivo la caracterización de parámetros bioquímicos que varíen con el desarrollo y que permitan un posterior estudio de su regulación. En

este sentido se han caracterizado una serie de proteínas cuyos niveles en los embriones varían con el desarrollo, algunas de estas proteínas son enzimas hidrolíticas, como proteasas (Osuna y col., 1977 a; Olalla y col., 1978), ribonucleasas (Sebastián y Heredia, 1978), deoxirribonucleasas (Cervera y col., 1980), Adenosín trifosfatasa (Conte y col., 1977; Ewing y col., 1974; Peterson y col., 1978), amino acil-tRNA hidrolasas (Miralles y col., 1978; Gallego, 1980); otras enzimas relacionadas con el metabolismo de los ácidos nucleicos, como las RNA polimerasas DNA dependientes (Renart y Sebastián, 1976; Osuna y col., 1977 b, 1980), o la acetil transferasa de histonas (Cano y Pestaña, 1976 y 1979); en otros casos se trata de enzimas mitocondriales (Vallejo y col., 1979; Cano y col., 1979). También se han detectado cambios durante el desarrollo en el caso de otras proteínas no enzimáticas, como por ejemplo en las distintas hemoglobinas identificadas en Artemia (Heip y col., 1978 a y b).

Varios laboratorios están interesados en la actualidad en la investigación de los mecanismos moleculares implicados en la expresión diferencial de estas proteínas durante el desarrollo. Es generalmente aceptado que la expresión diferencial de distintas proteínas durante el desarrollo se debe a la expresión diferencial de los genes que las codifican (Davidson, 1976). Ahora bien, la regulación de la expresión de los genes puede hacerse a varios niveles: transcripcional, de procesamiento de los mRNA, de traducción o de procesamiento de los productos de traducción. La existencia de moléculas con capacidad informacional en los embriones enquistados de Artemia hace especialmente interesante conocer cuál de estos posibles niveles es responsable de la regulación de la expresión de estas proteínas.

Desde el punto de vista de la regulación genética, Artemia es similar a los sistemas de oocitos en el sentido de que todos estos sistemas están en una situación de espera. En un momento determinado reciben una señal, la fecundación en el caso de los oocitos, la hidratación en el caso de los quistes de Artemia, que da lugar al comienzo de un proceso de diferenciación y desarrollo. La diferencia estriba en que los quistes de Artemia parten de un estado de gástrula, es decir, ya han sufrido una diferenciación previa, situación que es también la de las semillas vegetales.

EL ALMACENAMIENTO DE mRNAs EN LAS GASTRULAS ENQUISTADAS DE ARTEMIA

En el embrión enquistado de Artemia se hallan detenidos los procesos biosintéticos, como se ha indicado anteriormente. La síntesis proteica se reanuda poco después de la activación del quiste (Hultin y Morris, 1968; Clegg y Golub, 1969; Sierra y col., 1976; Amaldi y col., 1977). Esta síntesis inicial se supone que es dirigida por mRNA almacenado en el embrión por analogía con otros sistemas, aunque se desconoce el papel que juega el mRNA almacenado y el momento en que se reanuda la síntesis de mRNA, dada la impermeabilidad del embrión enquistado a presursores radioactivos (Finamore y Clegg, 1969).

Los embriones enquistados de Artemia contienen mRNAs almacenados, los cuales se han podido aislar y traducir en sistemas acelulares de E. coli (Nilsson y Hultin, 1972, 1975) y de germen de trigo (Sierra y col., 1976). Se ha demostrado que existen poblaciones de mRNAs almacenados poliadénilados y sin poliadenilar (Sierra y col., 1976; De Herdt y col., 1979). Tanto unos como otros están asociados a

proteínas formando complejos ribonucleoproteicos (RNPs) que se encuentran tanto en el sobrenadante posmitocondrial como asociados a membranas (Grosfeld y Littauer, 1975; Slegers y Kondo, 1977; Amaldi y col., 1977; Simons y col., 1978; Slegers y col., 1979; DeHerdt y col., 1979).

El mRNA almacenado en Artemia posee algunas características peculiares que lo diferencian del mRNA almacenado en oocitos. El mRNA de embriones enquistados parece representar una población de mRNAs de tamaño relativamente pequeño constituido fundamentalmente por RNA altamente repetido (más del 45% del mRNA está repetido más de 1000 veces por célula), aumentando la complejidad del mRNA unas 3 veces entre el embrión enquistado y la nauplia recién emergida (James y col., 1979). Se han identificado dos proteínas de bajo peso molecular que están codificadas por el mRNA de embriones enquistados pero no por el mRNA de nauplias, así como proteínas que están codificadas por el mRNA de nauplias y no por el de embriones enquistados (Grosfeld y Littauer, 1976; James y col., 1979).

Actualmente no se conocen los mecanismos por los que se encuentra reprimida la síntesis de proteínas en el embrión enquistado. El mRNA purificado presenta las estructuras típicas de los mRNAs como el dinucleósido 5'-5' trifosfato de su extremo 5' (Muthukrishman y col., 1975; Groner y col., 1976) y la cadena poliadenílica presente en el extremo 3' en una proporción importante de los mRNAs (Nilsson y Hultin, 1975). Por otra parte, se encuentran también todos los componentes del sistema de traducción, ribosomas (Hultin y Morris, 1968; Clegg y Golub, 1969), factores de iniciación (MacRae y col., 1979), de elongación (Sierra y col., 1974) y de terminación (Reddington, 1978).

Dos posibles mecanismos podrían estar implicados en la regulación de la síntesis proteica tras la reanudación del programa de desarrollo. Por una parte, la existencia de inhibidores del proceso global de síntesis de proteínas y por otro, la activación de los mRNAs presentes en el embrión y que se encuentran **reprimidos** en los complejos ribonucleoproteicos.

Se han descrito en Artemia distintos inhibidores del proceso de traducción in vitro. En este sentido se ha identificado un RNA de bajo peso molecular compuesto en un 50% por nucleótidos de uridina (Lee-Huenag y col., 1976; Slegers y col., 1977b). Los niveles de este inhibidor, que teóricamente debería estar únicamente presente en los embriones enquistados, son, sin embargo, constantes a lo largo del desarrollo, por lo que para darle un papel biológico en la regulación de la síntesis de proteínas hay que postular la inducción de un componente que contrarreste el efecto del inhibidor, componente que no ha podido ser caracterizado todavía. Por otra parte, se ha descrito recientemente la existencia en Artemia de una proteína de peso molecular 40.000 con gran afinidad por ácidos nucleicos de cadena simple y que inhibe la traducción in vitro (Marvil y col., 1980; Nowak y col., 1980).

Un mecanismo alternativo o complementario para la regulación de la síntesis proteica se basaría en la activación de los mRNAs almacenados. En esta hipótesis, los mRNAs presentes en el embrión enquistado de Artemia representarían formas de almacenamiento de los mRNAs no disponibles directamente para su traducción hasta la existencia de alguna señal que daría lugar a una modificación en el complejo mRNA-Proteínas con la consiguiente derrepresentación del mRNA.

Las peculiaridades descritas del programa de desarrollo de Artemia, así como sus ventajas como modelo experimental hacen de este organismo un candidato ideal para estudiar los mecanismos moleculares implicados en la activación de los componentes informacionales presentes en los embriones enquistados y su posterior metabolismo, uno de los temas centrales de la biología molecular de la embrio génesis.

OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO DE INVESTIGACION

El objetivo global del presente trabajo de tesis doctoral es el conocimiento de las bases enzimáticas responsables de la poliadenilación y el papel de este proceso de modificación de los RNAs mensajeros en la regulación del desarrollo embrionario y larvario temprano de Artemia.

Este objetivo global se ha dividido en los siguientes objetivos parciales:

1. Caracterización del sistema enzimático responsable de la poliadenilación del RNA durante el desarrollo temprano de Artemia.
2. Metabolismo de las cadenas poliadenílicas durante el desarrollo.
3. Caracterización de los RNAs poliadenilados presentes en los embriones enquistados.
4. Papel de la poliadenilación en la activación de los mRNAs almacenados en los embriones enquistados.

II. MATERIALES Y METODOS

1. MATERIALES

1.1. Aparatos

Los embriones de Artemia, así como las levaduras, fueron cultivados en agitadores New Brunswick Scientific Co. Inc.

Las determinaciones de pH se efectuaron en un pHmetro E512 de la marca Metrohm Herisau.

Se utilizaron homogeneizadores de las marcas Pobel y Kontes Glass Co. con un motor de la casa Tri-R Investments, Mod K 43.

Las centrifugaciones se realizaron en las centrífugas de las casas Sorvall, modelo RC2-B y en una microfuga Beckman, modelo B. Las centrifugaciones de alta velocidad se realizaron en ultracentrífugas de las casas Spinco, modelo L 2 50 B y Beckman, modelo L5-65.

Las fracciones de las columnas se recogieron en colectores LKB 7000 UltraRac e ISCO 1200.

Las determinaciones espectrofotométricas se realizaron en espectrofotómetros de las marcas Cary, modelo 118, Gilford Instrument, modelo 2400-S y Hitachi 181. Las medidas de fluorescencia se realizaron en un espectrofluorómetro Perkin-Elmer, modelo 204.

Las medidas de radioactividad se determinaron en contadores de centelleo líquido de las marcas Nuclear-Chicago, modelo Mark-II y de la marca Beckman, modelo LS-100.

Las electroforesis se realizaron utilizando fuentes de alimentación de la casa Shandon, modelo Vokam SAE 2761 y de la marca Buchler Inc., modelo 3-1014 A. Cuando se requirió mayor voltaje se utilizó una fuente de alimentación de alto voltaje de la casa Savant Instruments Inc., modelo FP30A.

1.2. Material biológico

Los embriones enquistados de Artemia se obtuvieron de la compañía San Francisco Bay Brand Inc., Division de Metaframe Co., Menlo Park, CA. 94025, USA.

Las levaduras empleadas pertenecen a la especie Sacharomyces cerevisiae, habiéndose utilizado la cepa Y55, perteneciente a la colección de este laboratorio.

Para la obtención de reticulocitos se utilizaron conejos blancos New Zeland, de unos 3 Kgs. de peso.

El virus del mosaico del tabaco fué una donación del Dr. U. Rubio del Instituto Ferrán (CSIC).

1.3. Productos químicos

El RNA de Tórula y las ribonucleasas pancreática y T₁ se obtuvieron de la casa Calbiochem.

El Sephadex G-150, poli(A) sepharosa, poli(U)-sepharosa y los anfolitos fueron de Pharmacia Fine Chemicals.

De la casa Sigma se obtuvieron los nucleótidos, homoribonucleótidos, heteroribonucleótidos y la ATP-agarosa. De Bio-Rad el Bio-Rex-70, la celulosa cellex 410, bisacrilamida, TEMED y el Bio-Bed. La acrilamida y el nicotinamida-adenindinucleótido reducido se obtuvieron de la casa Merck.

Los filtros de fibra de vidrio fueron de la casa Wathman, modelo GF/C. La DEAE-celulosa de SERVA. La Oligo(dT)-celulosa de la casa Corporative Research Inc.

Las placas de PEI-celulosa fueron de la casa Nachery-Nagel Co., llevando incorporado un detector fluorescente.

Las enzimas láctico deshidrogenasa y piruvato kinasa fueron obtenidas de la casa Boehringer.

Los productos radioactivos, nucleótidos tritiados, ^{14}C -ITP, α (^{32}P)-ATP y ^{35}S -Metionina se obtuvieron de la compañía Radiochemical Centre, Amersham.

Los demás productos químicos utilizados en la realización de esta tesis doctoral fueron de un grado analítico de pureza, procediendo de las casa Merck, Carlo Erba, May & Baker y PROBUS.

1.4. Tampones

- T. Acetato: Acetato sódico 50 mM; Cl_2Mg 5 mM; ClK 25 mM; SDS 2%; pH 5,1
- T. BH: Tris-ClH 50 mM; EDTA 0,2 mM; Mercaptoetanol 5 mM; glicerol 20%; $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 0,6 M; pH 8,5
- T. BL: Tris-ClH 50 mM; EDTA 0,2 mM; Mercaptoetanol 5 mM; glicerol 20%; pH 8,5
- T. BR: Tris-ClH 0,1 M; EDTA 5 mM; SDS 0,5%; pH 9
- T. BSM: A. N,2 hidroxietil, N,2 etano sulfónico 10 mM; ClK 0,1 M; Cl_2Mg 5 mM; Sacarosa 0,15 M; pH 7,5

T.S: Tris-ClH 10 mM; ClK 10 mM; Acetato magnésico 5 mM; Mercaptoetanol 10 mM; pH 7,5

T. SSC: ClNa 0,15 M; Acetato sódico 0,015 M

T. TMN: Tris-ClH 10 mM; Cl₂Mg 1 mM; ClNa 0,1 M; pH 7,5.

1.5. Medios de cultivo

- a) Medio Dutrieu modificado (Dutrieu, 1961). La composición del medio se expresa en gramos/litro, siendo: ClNa 40; Cl₂Mg 5; SO₄Na₂ 2,5; ClK 0,6; Cl₂Ca 1; CO₃HNa 2; BrNa 0,1; BO₃H₃ 0,4.
- b) Sal marina liofilizada 39 gr/l. Este medio puede suplementarse con extractos de algas liofilizadas, del género Spirullina (Osuna y Sebastián, 1980).
- c) LPM: La composición de este medio, expresada en gramos/litro es: PO₄H₂K 15; SO₄Mg 0,25; ClK 0,1; ClNH₄ 2; ácido cítrico 1,4; extracto de levaduras 1; y glucosa 2%.

Los medios a) y b) se completaron con 20 mgr/ml de penicilina (30.000 U/l) y 0,1 gr/l de estreptomycin. Los medios se esterilizaron en autoclave antes de usarse.

2. METODOS

2.1. Tratamiento de los quistes y obtención de poblaciones sincronizadas de embriones y larvas en desarrollo

Los embriones enquistados en fase de gástrula pueden ser inducidos a continuar su desarrollo cuando se les incuban en

un medio acuoso de composición salina adecuada, dotado de O_2 y a una temperatura de $30^\circ C$. El proceso de inducción y el desarrollo posterior del embrión se consiguen en el laboratorio sometiendo los embriones enquistados a un proceso que podemos dividir en tres fases:

a) Tratamiento de los quistes: los quistes son lavados en agua desionizada a $4^\circ C$. El lavado tiene dos finalidades: quitar una serie de sustancias que acompañan a los quistes comerciales (tales como plumas, etc.) y eliminar los quistes de baja densidad que flotan en el agua, cuya viabilidad es escasa. El lavado se realiza añadiendo un litro de agua a 5-20 gr. de quistes, agitándolos y dejándolos después sedimentar, tras lo cual el agua de lavado y los quistes que flotan se eliminan por decantación. El lavado se repite dos veces y después se deja a los quistes en agua desionizada a $4^\circ C$ un mínimo de 3 horas para que se hidraten por ósmosis. Los quistes hidratados se decantan y se resuspenden en hipoclorito sódico al 0,1% durante 10 minutos. El tratamiento con hipoclorito tiene dos objetivos: eliminar contaminantes bacterianos y fúngicos y debilitar la cubierta coriónica que rodea al quiste para facilitar la emergencia de la nauplia. Tras los 10 minutos de tratamiento se elimina el hipoclorito por decantación y los quistes se lavan dos veces en agua desionizada a $4^\circ C$ para eliminar todo el hipoclorito. A continuación los quistes se resuspenden en Mertiolato al 1% durante 10 minutos con agitación continua para eliminar los posibles contaminantes bacterianos. Se quita el mertiolato por decantación y se lavan los quistes dos veces con agua desionizada a $4^\circ C$.

b) Eclosión y sincronización de las nauplias: Los quistes tratados se resuspenden en una disolución de $ClNa$ al 5% en agua desionizada, en proporción de 5 a 10 gr. de

quistes por litro de disolución y se colocan en un incubador New Brunswick con agitación continua (100 rpm) a 30°C. En estas condiciones los quistes eclosionan a las 18 horas de incubación, surgiendo las nauplias nadadoras, aunque el tiempo necesario para la eclosión puede variar ligeramente según la procedencia de los quistes. Las nauplias recién emergidas se pueden recoger en embudos de decantación, debido a su tendencia a agruparse en el fondo del embudo. Las nauplias recogidas a las 18 horas de incubación han eclosionado en un período de unas 2 horas.

c) Desarrollo de las nauplias: Las nauplias recién emergidas, recogidas en un volumen pequeño de medio, son resuspendidas en medio Dutrieu (Dutrieu, 1960) o en agua de mar liofilizada e incubadas a 30°C con agitación durante el período de tiempo deseado. Cuando se desea obtener nauplias de más de 40 horas de desarrollo, se suplementa el medio con homogenados de algas como se señala en Materiales para evitar el efecto deletéreo del ayuno. Las nauplias se recogen por filtración a través de lienzo si no han sido alimentadas, o a través de 4 capas de gasa si han sido alimentadas (las algas, que se retienen en el fieltro, pasan a través de la gasa).

2.2 Preparación de resinas para cromatografía

En general, las resinas utilizadas en las cromatografías en columna se prepararon para su uso de acuerdo con las instrucciones facilitadas por la casa suministradora. Para exponer brevemente estos procesos, vamos a dividir las resinas en cuatro grupos:

a) Resinas de intercambio iónico. Se han utilizado DEAE-celulosa y Bio-Rex 70. En ambos casos la preparación de la resina se realiza siguiendo los siguientes pasos: lavado en KOH 0,5 N durante 2 horas; lavado con agua desionizada en un embudo Buchner hasta que la resina esté a un pH de 8; lavado con ClH 0,5 N durante 2 horas; lavado con H₂O hasta pH 4; lavado con Tris-ClH 50 mM pH 8 hasta que la resina esté al pH del tampón. Este paso es especialmente importante en el caso del Bio-Rex 70, con gran capacidad de intercambio iónico, en que es necesario ajustar el pH con NaOH. Una vez que la resina está a pH 8, se equilibra con el tampón de elución de la cromatografía.

b) Resinas de gel filtración. Se han utilizado Sephadex G-25 y Sephadex G-150. La preparación supone únicamente su hidratación, para lo cual se hierven al baño maría en el tampón de elución durante un período mínimo de 5 horas para el Sephadex G-150 y de una hora para el Sephadex G-25.

c) Resinas de afinidad. La ATP-agarosa comercial está ya preparada para el uso inmediato o bien es necesario hidratarla en el tampón de elución. En cuanto a las columnas de poli(A)-sepharosa 4B y poli(U)-sepharosa 4B, su preparación requiere el siguiente tratamiento: la resina se hincha en ClNa 1 M, pH 7,5 (10 ml de tampón por gramo de resina) durante 10 minutos, montándose a continuación la columna; una vez montada la columna se lava con ClNa 0,1 M pH 7,5 (100 ml por gramo de resina) y luego con el tampón fosfato potásico 10 mM pH 7,5, EDTA 10 mM, formamida 90% (100 ml por gramo), tras lo cual se equilibra la columna con el tampón de elución (100 ml por gramo de resina), quedando la columna preparada para su uso.

La preparación de Oligo(dT)-celulosa se realiza lavando la resina con etanol (25 ml por gramo de resina), secándose después al vacío. Una vez seca, se equilibra con el tampón Hepes 10 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM. Se monta la columna y se lava con el mismo tampón (100 ml por gramo de resina). Por último, se lava la columna con 100 ml por gramo de Hepes 10 mM pH 7,5, EDTA 5 mM, ClNa 0,15 M.

Las columnas de Oligo(dT)-celulosa pueden ser regeneradas mediante un lavado con etanol. Posteriormente se somete a la resina al mismo tratamiento descrito para su preparación. Las columnas de Oligo(dT)-celulosa se regeneraron cada 3 ó 4 utilizations consecutivas.

d) El Bio-Bed fué embebido en agua estéril antes de su utilización. Para su regeneración fué lavado con metanol y posteriormente con agua estéril.

2.3. Procedimientos de homogeneización y fraccionamiento subcelular

Los procedimientos de homogeneización son diferentes en quistes y en nauplias. La homogeneización en quistes está dificultada por la presencia de una cubierta quitinosa muy dura y difícil de romper, que además actúa de abrasivo una vez rota, por lo que dificulta el mantenimiento de la integridad de los orgánulos subcelulares. Esta cubierta se puede solubilizar por tratamiento del quiste con hipoclorito sódico sin afectar la viabilidad de los embriones (Amat, 1980).

El fraccionamiento subcelular, por otra parte, está afectado por la presencia de las plaquetas de vitelo. Las plaquetas sedimentan junto con los núcleos, de los que es

muy difícil de separar (Renart, 1975); por otra parte tienden a agregarse entre sí, pudiendo atrapar estos agregados a otros componentes subcelulares, que aparecen de esta manera en la fracción plaquetaria en lugar de en su propia fracción. La cantidad de plaquetas es máxima en los quistes y va disminuyendo durante el desarrollo. Las nauplias recién emergidas contienen el 50% de las plaquetas de vitelo presentes en los quistes (Olalla y col., 1977).

2.3.1 Homogeneización y fraccionamiento subcelular de embriones enquistados: el primer paso en la homogeneización de quistes consiste en lavarlos con agua desionizada a 4°C, dos veces, para eliminar contaminantes y quistes ligeros. Cada vez se agitan los quistes en el agua y posteriormente se les deja sedimentar, quitando el agua de lavado por decantación. A continuación se tratan los quistes con hipoclorito sódico a la concentración que se indica en cada caso a 4°C para remover parte o toda la capa externa del corión.

Una vez tratados con hipoclorito, los quistes se lavan para eliminar el hipoclorito. Tres lavados con agua desionizada a 4°C son suficientes para quitar el hipoclorito del medio, incluso tras un tratamiento fuerte. Los quistes lavados se recogen por filtración a través de un lienzo.

Los quistes tratados se resuspenden en el tampón de homogeneización en proporción de 2,5 ml de tampón por gramo de quiste (pesados después del tratamiento) y se homogeneizan en un Potter mecánico Kontes-Duall a 400 rpm o en un homogeneizador manual. La homogeneización y el fraccionamiento subcelular posterior dependen del tampón utilizado en la homogeneización.

a) Tampón BL: Es el método usual para la obtención de enzima soluble, utilizando quistes tratados con hipoclorito al 0,1% durante 10 minutos. La homogeneización se continúa hasta lograr la rotura total de los quistes (unas 40 pasadas de émbolo del Potter) y el fraccionamiento subcelular comprende centrifugaciones a 15.000xg durante 15 minutos y 105.000xg durante 2 horas. El precipitado de la primera centrifugación contiene núcleos, plaquetas, mitocondrias y membranas; el precipitado de la segunda centrifugación contiene microsomas y el sobrenadante constituye la fracción soluble.

b) Tampón BSM: Este medio se ha utilizado en los estudios de distribución subcelular. Los quistes se tratan con hipoclorito sódico al 5% durante 30 minutos y la homogeneización se hace manualmente. El fraccionamiento subcelular comprende dos centrifugaciones: 6.000xg, 5 minutos y 15.000xg, 15 minutos. Los sedimentos contienen: núcleos y plaquetas el primero y mitocondrias y membranas el segundo. El sobrenadante de la segunda centrifugación contiene los ribosomas y polisomas, junto con el citosol y recibe el nombre de sobrenadante posmitocondrial (PMS). La fracción citosólica se obtuvo centrifugando la fracción PMS a 105.000xg durante 2 horas.

2.3.2. Homogeneización y fraccionamiento subcelular de nauplias. Las nauplias no poseen cubierta quitinosa, por lo que no precisan tratamiento con hipoclorito. La homogeneización se realizó en un Potter mecánico (400 rpm) o manual, siendo suficientes 5 pasadas de émbolo para conseguir la rotura total de las nauplias en todos los medios de homogeneización utilizados, que fueron:

a) BSM para los experimentos de distribución subcelular. Los fraccionamientos subcelulares fueron los descritos para quistes.

b) BH: se utilizó para solubilizar la actividad poli(A) polimerasa de las fracciones particuladas. El sulfato amónico origina la precipitación del DNA, dando gran viscosidad al homogenado. La fragmentación del DNA con objeto de evitar la coprecipitación de otros componentes durante la centrifugación se consigue homogeneizando con un Potter mecánico hasta que el homogenado deja de presentar la viscosidad debida a DNA. El homogenado se centrifuga a 15.000xg, 15 minutos y a 105.000xg, 2 horas; el sobrenadante de la última centrifugación constituye la fracción soluble.

2.4. Ensayos enzimáticos

2.4.1. Poli(A) polimerasa

La actividad poli(A) polimerasa se determinó midiendo la incorporación de ATP marcado radioactivamente en macromoléculas caracterizadas por su insolubilidad en ácido tricloroacético (TCA), siguiendo el método descrito por Half y Keller (1973).

La mezcla de ensayo en un volumen de 0,15 ml tiene la siguiente composición: Tris-ClH 50 mM, pH 8,5; Cl_2Mn 2 mM; RNA de *Tórula* 0,2 mgr; $1 \mu Ci(8^3H)ATP$ y ATP 0,12 mM. El ATP estaba marcado con tritio en el carbono 8 de la adenina; la actividad específica del ATP en la mezcla de ensayo era de 25-30 CPM por pico mol. La reacción se inicia con la

adición del enzima, se incubaba a 30°C durante 30 minutos y se termina con la adición de 3 ml de una mezcla de TCA al 5% y pirofosfato tetrasódico al 2%, mezcla que estaba a una temperatura de 4°C.

Después de tener los tubos 20 minutos a 4°C, el material precipitado en ácido se recogió por filtración a través de filtros de fibra de vidrio Wathman GF/C. Cada filtro fué lavado dos veces con 15 ml de la mezcla de TCA y pirofosfato tetrasódico. La radioactividad retenida en el filtro se determinó en un contador de centelleo líquido; para ello fué preciso secar los filtros bajo una lámpara de luz infraroja e introducirlo en un vial conteniendo 2,5 ml de un líquido de centelleo compuesto por la disolución de 5,5 gr de Permablend en tolueno.

La utilización de pirofosfato tetrasódico en la mezcla ácida tiene como finalidad reducir la retención de ATP en los filtros de fibra de vidrio por absorción. Con el mismo fin los filtros se empapan en agua antes de filtrar la mezcla de ensayo precipitada. El fondo o blanco de radioactividad se determina en cada ensayo añadiendo simultáneamente el enzima y la mezcla ácida.

Se define una unidad de actividad poli(A) polimerasa como la cantidad de enzima capaz de incorporar un nanomol de AMP en producto insoluble en ácido en una hora de incubación en las condiciones habituales de ensayo.

2.4.2. ATPasa

Se han empleado dos métodos basados respectivamente en la valoración del ADP y del fosfato producidos en la hidrólisis del ATP.

a) Para la valoración del ADP se ha seguido el método descrito por Pascual-Salcedo (1979). La preparación cuya actividad ATPásica se quiere medir se incuba en 1 ml en presencia de 0.05 mM ATP, 2mM Cl_2Mn y el sistema auxiliar compuesto por Hepes 50 mM. pH 7,4; ClK 100 mM; Cl_2Mg 5 mM; ácido fosfoenolpirúvico 2 mM; DPNH 0,2 mM; una unidad del enzima láctico deshidrogenasa y una unidad del enzima piruvato quinasa. Este sistema auxiliar transforma el DPNH en DPN en presencia de ADP; la conversión de DPNH en DPN se puede determinar midiendo la variación de absorción óptica de la mezcla de ensayo a 340 nm y es equimolecular con el ADP producido en la reacción de la ATPasa.

b) Para la valoración del fosfato se ha utilizado el método descrito por Serrano (1978). La preparación se incuba en un volumen de 0,2 ml en presencia de ATP 0,25 mM y Cl_2Mn 2 mM en un medio tamponado con Tris-ClH 50 mM pH 8,5 durante 30 minutos a 30°C. La cantidad de fosfato formado al cabo de 30 minutos se valora añadiendo 0,4 ml de una disolución conteniendo: SO_4H_2 0,72 N, molibdato sódico 0,5% y SDS 0,5%; a continuación se añaden 0,025 ml de ácido ascórbico al 2%, se incuban los tubos 5 minutos a 30°C y se mide la absorción óptica a 750 nm, que es proporcional a la concentración de fosfato en un rango de 8 a 80 nM.

2.4.3 Fosfatasa alcalina

La actividad se valora en una mezcla de ensayo de 1 ml que contiene Tris-ClH 50 mM pH 8,5 y bis-para Nitro fenil fosfato 5 mM. La reacción se inicia por adición del enzima y se sigue la hidrólisis del bis-para Nitro fenil fosfato en nitro benceno por aumento de la absorción óptica a 410 nm. Este método ha sido descrito por Garen y Leventhal (1960).

2.4.4. RNasa

La actividad ribonucleósica se determinó incubando la preparación enzimática con ^{32}P -rRNA de levadura, según el método descrito por Sebastián y Heredia (1978). La reacción se incubó a 30°C durante 30 minutos. Al final de la incubación se añadieron 3 ml de ácido tricloroacético al 5% y pirofosfato tetrasódico a 2%. La radioactividad insoluble de ácido se determinó filtrando la mezcla de ensayo a través de filtros de fibra de vidrio (GF/C). La radioactividad retenida en los filtros se determinó en un contador de centelleo líquido, siguiendo el método descrito en el ensayo de la actividad poli(A) polimerasa.

2.5. Métodos de separación de nucleótidos

Ha sido necesario realizar la separación de nucleótidos para diferentes experimentos, fundamentalmente de comprobación del grado de pureza de reactivos, cálculo de la longitud de la cadena poliadenílica sintetizada por el enzima, unión de esta cadena al extremo 3' del RNA iniciador y especificidad del enzima para el nucleótido en posición 3' del RNA iniciador. Para estos experimentos se han empleado varias técnicas, fundamentalmente de dos tipos:

2.5.1. Métodos cromatográficos

Se ha utilizado la cromatografía en capa fina sobre placas de PEI-celulosa, usando eluyentes diferentes según la naturaleza de los nucleótidos que se querían separar; se han empleado 5 sistemas de elución:

a) Elución con H_2O (Reyes, 1972). Este eluyente sirve para separar los nucleótidos de los nucleósidos y bases, puesto que nucleósidos y bases migran con el frente ($R_f=1$) mientras que los nucleótidos, cargados negativamente, quedan en el origen ($R_f=0$).

b) Elución con PO_4H_2K 0,5 M pH 3,4. Basado en el trabajo de Reyes en 1972. Con este eluyente se separan los nucleótidos entre sí según el número de fosfatos que tengan, migrando más rápidamente cuando menos fosfatos posean, así los R_f para los nucleótidos de adenina son: AMP: 1, ADP: 0,7, ATP: 0,4. Los R_f para los nucleótidos de otras bases son similares. Este método se ha empleado habitualmente para comprobar que los nucleótidos trifosfato usados como sustrato de la poli(A) polimerasa no estaban hidrolizados.

Este método también se ha empleado para separar el AMP resultante de la hidrólisis alcalina del producto de la reacción de la poli(A) polimerasa del ATP empleado como sustrato de la reacción.

c) Elución con una mezcla de ácido bórico al 4% y $ClLi$ 2 M en proporción de 4:3 (Randerath, 1963). Se ha utilizado para separar ATP de dATP en comprobación de la pureza del segundo.

d) Elución con formiato amónico 0,5 M pH 3,5 para separar el 2' ó 3' AMP del 2' ó 3' GMP, siguiendo el método descrito por Randerath y Randerath (1967).

e) Cromatografía bidimensional para separar los cuatro nucleótidos 2' ó 3' monofosfato resultantes de la hidrólisis alcalina del RNA. Esta separación se realizó según el método descrito por Schiller y Perry (1976). El método

original consiste en una cromatografía bidimensional, en la primera dimensión el tampón utilizado es ClLi 1 M y en la segunda, ácido acético 1 M. Los Rfs de los nucleótidos 2' ó 3' monofosfato, así como del ATP en ambas direcciones se muestran en la Tabla I. En estas condiciones no se logran separar el AMP y el CMP. Esta separación sólo la hemos conseguido bajando la concentración de ácido acético en la segunda dimensión, puesto que los Rfs utilizando ácido acético 0,5 M son: AMP 0,7 y CMP 1, y a una concentración de ácido acético de 0,1 M son: AMP 0,26 y CMP 1, por lo cual se modificó el método original empleando ácido acético 0,1 M en la segunda dimensión del cromatograma.

TABLA I

MIGRACION RELATIVA DE LOS NUCLEOSIDOS 2'-3' MONOFOSFATO EN PLACAS DE PEI-CELULOSA EN CROMATOGRAFIAS BIDIMENSIONALES.

<u>XMP</u>	<u>Rf</u>	
	<u>1^a dimensión</u>	<u>2^a dimensión</u>
AMP	0,45	0,85
CMP	0,46	0,88
GMP	0,49	0,38
UMP	0,63	0,96
ATP	0,04	0,86

2.5.2. Métodos de electroforesis de alto voltaje

Esta técnica se empleó para separar los cuatro nucleósidos 2' ó 3' monofosfato resultantes de la hidrólisis alcalina del RNA (Smith, 1967). La electroforesis se realiza sobre papel Wathman 3MM. El tampón utilizado fué: piridina 0,05%, ácido acético 0,5%, EDTA 1 mM pH 3,5. El voltaje utilizado fué 3.200 V y se dejaron correr las muestras durante 2,5 horas. La movilidad de los diferentes ribonucleósidos 2' ó 3' monofosfato, así como las de la adenosina y el ATP se muestran en la Tabla II referidas a la movilidad del 2' ó 3' UMP. Los valores se consideran positivos si la sustancia migra hacia el ánodo y negativos si migran hacia el cátodo.

Tras la separación de los nucleótidos por alguno de los métodos señalados se cuantifican contando la correspondiente radiactividad, tras secar la placa o el papel de electroforesis y recortar el lugar ocupado por el nucleótido estudiado. En otros casos, cuando se quería conocer con mayor exactitud la posición y radioactividad de los nucleótidos, la placa de cromatografía o el papel de electroforesis se cortó en tiras transversales de 3 mm en el primer caso y de 1 cm en el segundo, determinándose el perfil obtenido en la cromatografía o electroforesis, al mismo tiempo que se cuantificaba la radioactividad de los nucleótidos separados.

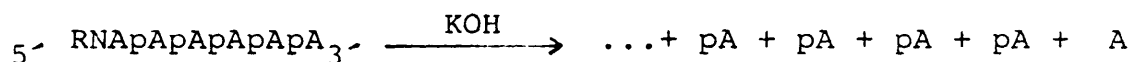
TABLA II

MIGRACION RELATIVA DE LOS NUCLEOSIDOS 2'-3' MONO-
FOSFATO SOMETIDOS A ELECTROFORESIS DE ALTO VOLTAJE

<u>XMP</u>	<u>Longitud recorrida /</u> <u>Long. recorrida por UMP</u>
AMP	0,25
CMP	0
GMP	0,83
UMP	1
ATP	1,22
Aden.	- 0,55

2.6. Cálculo de la longitud del segmento de ácido poliadenílico sintetizado por la poli(A) polimerasa

La longitud del segmento poliadenílico sintetizado por el enzima se calculó según el método de Winters y Edmonds (1973), método que se basa en lo siguiente: la cadena poliadenílica se sintetiza en dirección 5' → 3' a partir del ATP; esto quiere decir que el nucleótido 3' terminal de la cadena poliadenílica tiene el carbono 3' libre, sin unir a ningún fosfato. Si este ácido poliadenílico se somete a hidrólisis alcalina, en la cual se rompen los enlaces entre el fosfato y el carbono en 5' de la base, las adeninas internas de la cadena poliadenílica dan lugar a 2' ó 3' AMP y la adenina 3' terminal, al romperse el enlace que mantenía con un fosfato a través de su carbono 5' y tener el carbono en 3' libre, queda como adenosina:



De cada cadena de ácido poliadenílico se forma una sola molécula de adenosina. Si las adeninas están marcadas, la radioactividad presente en AMP más la presente en adenosina tras la hidrólisis representará el número total de adeninas de las cadenas y la radioactividad presente en adenosina es proporcional al número de cadenas, por lo cual la longitud media de cada cadena se puede estimar como:

$$\frac{\text{CPM}_{\text{AMP}} + \text{CPM}_{\text{Adenosina}}}{\text{CPM}_{\text{Adenosina}}}$$

El proceso experimental es el siguiente: tenemos una reacción enzimática en la que queremos determinar la longitud de la cadena poliadenílica sintetizada. La reacción se

para por adición de 0,8 ml de Cl Na 0,3 M y 2 ml de etanol, manteniendo a continuación los tubos de ensayo a -20°C un mínimo de tres horas, con lo cual el producto de reacción, que es poli(A) unido al RNA iniciador, precipita y el sustrato ATP queda en forma soluble. El precipitado se recoge por centrifugación a $15.000\times g$ 15 minutos y se resuspende en 50 μl de KOH 0,3 N, incubándose a 37°C durante 18 horas para que tenga lugar la hidrólisis alcalina.

Tras la hidrólisis, la separación de la adenosina del 2' ó 3' AMP y del ATP que puede quedar como contaminante se realiza por cromatografía de capa fina en PEI-celulosa en dos etapas, después de neutralizar las muestras con ClH. En la primera etapa de la cromatografía se emplea agua desionizada como eluyente, separándose la adenosina, que migra con el frente, de los nucleótidos. Una vez corrido el primer eluyente se seca la placa y se corre de nuevo, en la misma dirección, con $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 0,5 M pH 3,4 hasta que el frente de humedad llega al lugar alcanzado por la adenosina en la primera elución. En esta segunda etapa se separan entre sí los tres nucleótidos de la adenina (AMP, ADP y ATP).

La placa de cromatografía se corta a continuación en tiras transversales de 3 mm de anchura, las cuales se cuentan en un contador de centelleo líquido con el fin de cuantificar la radioactividad presente en forma de adenosina y 2' ó 3' AMP. A partir de estos datos se calcula la longitud de la cadena poliadenílica sintetizada.

2.7. Procesos de extracción de RNA

La extracción de RNA se ha realizado mediante dos técnicas de purificación: precipitación con etanol para separarlo de moléculas de bajo peso molecular y fenolización

para separarlo de las proteínas. Para evitar la degradación del RNA todos los tampones utilizados fueron tratados con dietil pirocarbonato al 0,1% y esterilizados previamente. Según la naturaleza del RNA que se quería extraer se ha seguido tres procedimientos diferentes:

1. Extracción de rRNA. La fracción subcelular conteniendo ribosomas y polisomas fué resuspendida en tampón acetato con dodecil sulfato sódico al 0,5%. El RNA se extrajo por fenolización, para ello se añadió un volumen de fenol (equilibrado en tampón acetato), se agitó durante 30 minutos, separándose posteriormente la fase acuosa de la fenólica por centrifugación a 15.000xg 15 minutos. La fase acuosa, conteniendo el RNA se recogió y fenolizó otras dos veces. La fase acuosa de la tercera fenolización fué precipitada con 0,1 volúmenes de acetato sódico al 20% y dos volúmenes y medio de etanol y mantenida a -20°C toda la noche. El RNA precipitado se sedimentó por centrifugación a 15.000xg durante 15 minutos. El precipitado se lavó con eter etílico para eliminar los restos de fenol y se resuspendió en agua desionizada estéril.

2. Extracción del RNA poliadenilado. El RNA poliadenilado se pierde en extracciones fenólicas a pH 5, por lo tanto la fenolización debe realizarse conservando dos condiciones: un pH alto, alrededor de 9, y haciendo la extracción en una mezcla de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (50:50:1). Dentro de estas dos condiciones se han seguido dos procedimientos:

a) Extracción de fracciones subcelulares: Los precipitados conteniendo las distintas fracciones subcelulares se resuspendieron en tampón BL al que se añadió SDS hasta 0,5% y fueron fenolizadas dos veces, en cada ocasión se les añadió medio volumen de fenol equilibrado en 0,2 M Tris, se

agitó la mezcla durante 5 minutos y se añadió medio volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (50:1), agitándose la mezcla durante 30 minutos. Las fases acuosa y orgánica se separaron por centrifugación a 15.000 xg, 15 minutos. La fase acuosa de la segunda fenolización se precipitó con 0,1 volúmenes de acetato sódico al 20% y 2,5 volúmenes de etanol, manteniéndose la mezcla a -20°C toda la noche; el precipitado, recogido por centrifugación, se lavó con eter etílico y se resuspendió en agua desionizada estéril tratada con dietil pirocarbonato (0,1%).

b. Extracción de fracciones de gradientes: el primer paso fué precipitar cada fracción con 0,1 volúmenes de acetato sódico al 20% y 2,5 volúmenes de etanol, manteniendo las fracciones a -20°C toda la noche. El precipitado se recogió por centrifugación a 9.000xg, 15 minutos y se resuspendió en 1 ml de tampón BR. Se añadió a cada fracción 0,5 ml de fenol equilibrado en 0,2 M TRis, se agitó durante 5 minutos y se añadieron otros 0,5 ml de cloroformo-alcohol isoamílico (50:1), agitándose durante 30 minutos. La fase acuosa se separó de la fase orgánica por centrifugación a 9.000xg, 15 minutos y se precipitó con 0,1 volúmenes de acetato sódico al 20% y 2,5 volúmenes de etanol, teniendo los tubos a -20°C toda la noche. El precipitado se recogió por centrifugación a 9.000xg 15 minutos, se lavó con eter etílico y se resuspendió en agua desionizada estéril tratada con dietil pirocarbonato (0,1%).

3. Extracción del RNA del virus del mosaico del tabaco: El virus fué resuspendido en tampón acetato con SDS (0,5%). El RNA fué extraído por adición de 1 volumen de fenol saturado en tampón acetato por dos veces consecutivas. La mezcla se agitó durante 30 minutos, sometándose a continuación a una centrifugación a 15.000xg durante 15 minutos. A la fase acuosa de la segunda extracción con fenol le fué añadido 0,1 volúmenes de acetato sódico al 20% y 2,5 volúmenes de etanol. El RNA precipitado, tras tener esta mezcla a -20°C una noche, fué recogido por centrifugación a 15.000xg

durante 15 minutos y resuspendido en agua estéril tratada con dietil pirocarbonato (0,1%).

2.8. Obtención de ^{32}P -rRNA de levadura

Las levaduras se crecieron en un medio con bajo contenido de fosfato (LPM) hasta que alcanzaron una concentración correspondiente a la mitad de la fase exponencial de su curva de crecimiento. En este momento se añadieron al medio 5 mCi de fosfato conteniendo ^{32}P , continuando el crecimiento de las levaduras durante tres tiempos de generación más (6 horas), al cabo de los cuales se recogieron las levaduras por centrifugación, lavándolas dos veces con medio fresco no radioactivo. Las levaduras se homogeneizaron en un mortero, usándose arena lavada con ácido como abrasivo; la homogeneización se realizó en tampón S y se obtuvo la fracción ribosomal, a partir de la cual se obtuvo el rRNA marcado con ^{32}P usando el procedimiento descrito en el apartado de extracción de RNA.

2.9 Cuantificación del ácido poliadenílico en preparaciones de RNA

La cantidad de ácido poliadenílico presente en preparaciones de RNA se determinó midiendo la cantidad de ^3H -poli(U) capaz de hibridar con este RNA, siguiendo una modificación de los métodos descritos por Sullivan y Roberts, 1973; Rosbash y Fard, 1974; y Slegers y Kondo, 1977.

La hibridación con ^3H -poli(U) se realizó en un volumen de ensayo de 0,5 ml. El medio de hibridación contiene tampón SSC cuya concentración es doble de la descrita en el apartado "Tampones", es decir, 0,3 M ClNa y 0,03 M citrato

sódico, 300 ngr de ^3H -poli(U) cuya actividad específica es de 50-200 CPM/ng y el RNA cuyo poli(A) se quiere valorar. Para que la hibridación se lleve a cabo los tubos de ensayo se incuban a 45°C durante 18 horas.

Tras las 18 horas de incubación, el ^3H -poli(U) que no ha hibridado con poli(A) se degrada mediante una incubación de la mezcla de hibridación con ribonucleasa pancreática, enzima que degrada el RNA monocatenario pero no el bicatenario. Esta degradación se efectúa añadiendo al medio de hibridación ribonucleasa pancreática hasta alcanzar una concentración de $30\ \mu\text{g/ml}$ ($15\ \mu\text{g}$ por ensayo) e incubando la mezcla 15 minutos a 30°C . La reacción de hidrólisis se para por adición de $0,15\ \text{mg}$ de RNA de Tórula y $3\ \text{ml}$ de una mezcla ácida conteniendo TCA al 5% y acetato de uranilo al 0,1%. El ^3H -poli(U) que por estar hibridado con poli(A) no ha sido degradado por la ribonucleasa precipita tras estar 15 minutos en esta mezcla ácida a 4°C . El RNA de Tórula y el acetato de uranilo se añaden por ser coadyuvantes en esta precipitación y son necesarios por la escasa cantidad de híbrido poli(A)-poli(U) que hay en cada tubo de ensayo. La radioactividad precipitada tras la hibridación y la hidrólisis fué determinada por filtración de la mezcla de ensayo a través de filtro de fibra de vidrio GF/C y posterior conteo de la radioactividad de los filtros, de forma similar a la que se ha descrito en el ensayo de la actividad poli(A) polimerasa.

En la Figura 1 se presenta una curva patrón resultado de un experimento en el que se aplicó el método de cuantificación a cantidades conocidas de ácido poliadenílico. Como se puede ver, la cantidad de ^3H -poli(U) hibridada varía linealmente con la cantidad de poli(A) presente en la

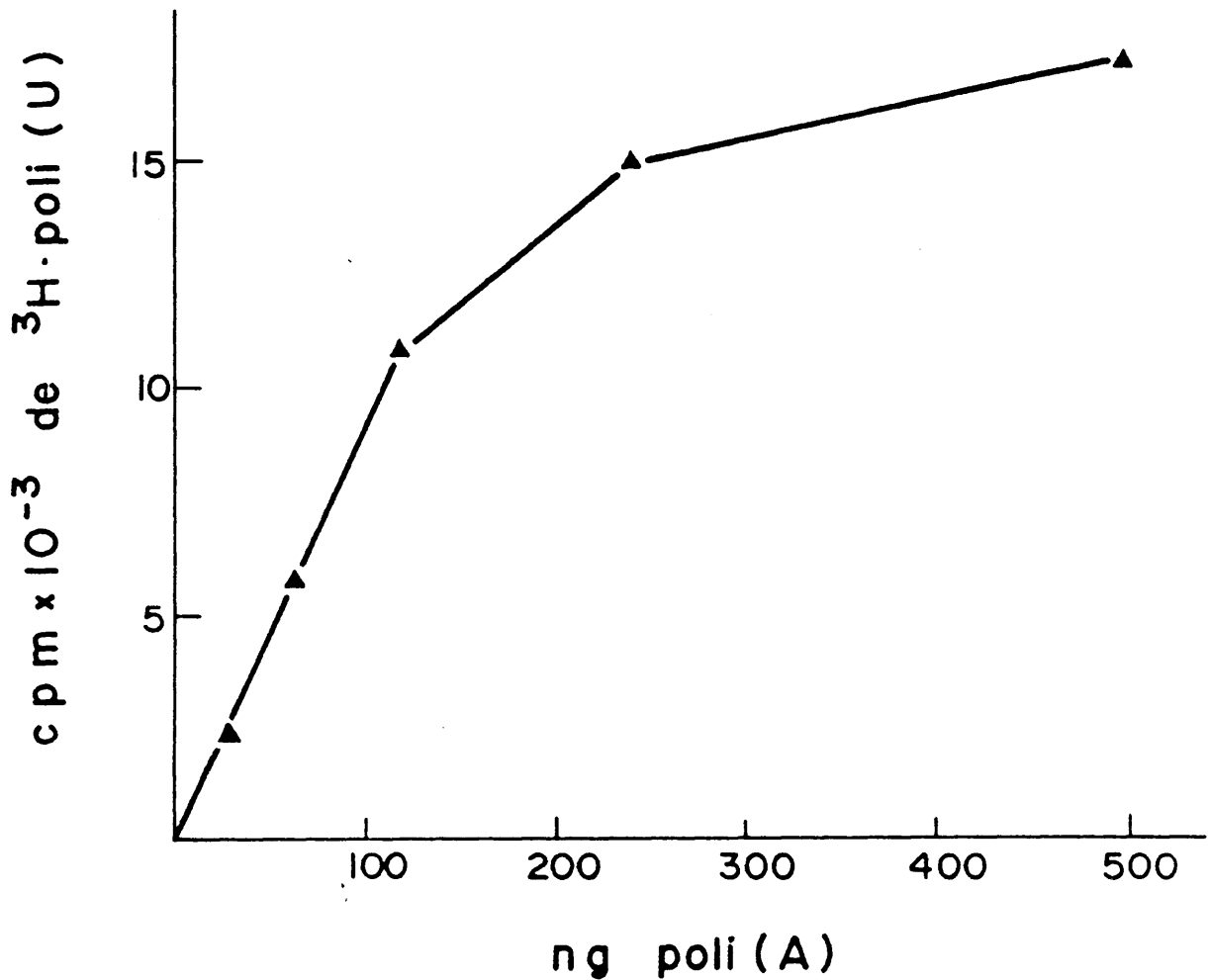


Figura 1. Curva de hibridación del ácido poliadenílico con ácido poliuridílico marcado con tritio

Se sometieron a hibridación cantidades conocidas de ácido poliadenílico con 300 ng de ácido poliuridílico de actividad específica 60 cpm/ng. La hibridación se llevó a cabo en 0,5 ml del tampón SSC concentrado dos veces a 45°C durante 18 horas.

hibridación en un rango de 25 a 200 ng de poli(A) en las condiciones de ensayo descritas. En estas condiciones se forman complejos binarios en que cada cadena de poli(A) hibrida con una cadena de poli(U) y también complejos ternarios en que cada cadena de poli(A) hibrida con dos cadenas de poli(U); hemos calculado que, por término medio, en las condiciones descritas, cada cadena de poli(A) hibrida con 1,2 cadenas de poli(U).

La actividad específica del ^3H -poli(U) varía de un experimento a otro, por esto en cada experimento se realizó un patrón de hibridación con varias cantidades de poli(A) a partir del cual se calculó la cantidad de poli(A) existente en los RNAs problema.

2.10. Valoración de componentes bioquímicos

2.10.1. Valoración de proteínas

Las proteínas se valoraron de acuerdo con los métodos descritos por Lowry y col. (1951) y por Bradford (1976), utilizando en ambos casos seroalbúmina bovina como proteína patrón.

2.10.2. Valoración de DNA

El DNA se valoró mediante la utilización del ácido diamino benzoico, según ha descrito Pestaña, A. y col. (1978). Las preparaciones de DNA se mezclan con 20 ng de ácido diamino benzoico en un volumen de 0,1 ml. Se incuban a 60°C durante 10 minutos. A continuación se dejan enfriar los tubos hasta alcanzar la temperatura ambiente y se añaden 2 ml de ClH 0,1 N, midiéndose la fluorescencia. La

longitud de onda de la fuente excitadora fué 350 nm, midiéndose la luz emitida a una longitud de onda de 490 nm. En estas condiciones la fluorescencia es línealmente proporcional a la cantidad de DNA entre 0 y 30 μ g de DNA por ensayo.

2.10.3. Valoración de ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos totales se cuantificaron midiendo la absorción óptica de las preparaciones a 260 nm. Se considera que una disolución de 1 mg/ml de ácidos nucleicos es de 25 unidades de absorción óptica, usando cubetas de 1 cm de grosor. La cantidad de RNA se estimó restando a la cantidad de ácidos nucleicos totales la cantidad correspondiente al DNA, que había sido determinado por el método del ácido diamino benzoico.

2.11. Técnicas de electroforesis en gel

2.11.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico

Este sistema de electroforesis fué utilizado para la separación de proteínas. El sistema de electroforesis en placas de vidrio se basa en el descrito por Laemli (1970). La electroforesis se realizó en placas de acrilamida de dimensiones 15 cm x 10 cm x 0,1 cm. Este método utiliza dos geles superpuestos de poliacrilamida para obtener una mejor resolución de las bandas de proteína. El gel superior, de 3 cm de altura, tiene una concentración muy baja de acrilamida, el 3%, siendo su pH de 6,8, es decir, inferior al del tampón de cubetas y al del gel inferior. Esta diferencia de pHs hace que se forme un frente de iones que migra a lo

largo de este gel superior al comienzo de la electroforesis. La formación de este frente de iones en el gel de baja concentración produce la concentración de las muestras al atravesar este gel. El gel inferior, de 7 cm de altura, tiene una concentración alta de acrilamida, 7% ó 10% según los casos, en el se separan las proteínas por su peso molecular. La composición de los dos geles es:

a. Gel de concentración: Tris-ClH 0,125 M pH 6,8; Acrilamida 3%, Bisacrilamida 0,25%; Dodecil sulfato sódico 0,1%. Para lograr la gelificación se añaden TEMED al 1% y Persulfato amónico 0,375 mgr/ml.

b. Gel de resolución: consta del 7% ó del 10% de acrilamida y la correspondiente concentración de Bisacrilamida (manteniendo la relación de 40 gr de Acrilamida por cada gramo de Bisacrilamida) en el tampón Tris-ClH 0,37 M pH 8,8 y dodecil sulfato sódico 0,1%. Se gelifica en reacción catalizada por TEMED (2%) y persulfato amónico (0,094 mg/ml).

Las muestras de proteínas que fueron sometidas a electroforesis se precipitaron con ácido tricloroacético al 10%, en presencia de 10 μ gr de poli(A) por ml durante 12 horas a 4°C, recogiendo el precipitado por centrifugación a 9.000xg durante 10 minutos. A continuación se lavó el precipitado con una mezcla de etanol-eter etílico (1:1) por dos veces y una vez más con eter etílico. Después de estos lavados las muestras se resuspendieron en el tampón: Tris-ClH 60 mM pH 6,8, dodecil sulfato sódico al 2%, 2-mercapto etanol 0,7 M, 10% de glicerol y 0,5% de azul de bromofenol. Por último, fueron calentadas a 90°C durante 5 minutos, para conseguir la desnaturalización de las proteínas, y aplicadas en el gel.

La composición del tampón de cubetas es la siguiente: Tris 50 mM, glicina 0,38 M, dodecil sulfato sódico 0,1%, pH 8,5.

La electroforesis se corrió a un voltaje constante de 80 V, mientras las muestras estuvieron en el gel de concentración, y de 110 V a partir de entonces. La electroforesis se paró cuando el frente de azul de bromofenol llegaba a 0,5 cm del borde inferior de la placa.

Una vez finalizada la electroforesis se fijaron las proteínas por inmersión de la placa de gel en ácido acético al 7% durante una hora. Las proteínas se tiñeron teniendo la placa dos horas en una solución de metanol al 45%, ácido acético al 10% y azul de Coomassie G-250 al 0,25%. El colorante no unido a proteínas fué retirado lavando la placa en una disolución acuosa de ácido acético al 7,5% y metanol al 20%.

2.11.2. Electroforesis en gel de agarosa al 1,4%

Este sistema electroforético fué desarrollado por McDonell y col. (1977) para la separación electroforética de RNAs. Se utilizaron geles en placa, cuyas dimensiones son: 15 cm x 22 cm x 0,3 cm. El gel consiste en una disolución de agarosa al 1,4% (peso/volumen) en tampón fosfato potásico, 10 mM, pH 7.

La disolución se calienta a 100°C para fundir la agarosa, dejándose luego enfriar hasta unos 60°C, temperatura a la que se coloca entre las placas de vidrio para que tenga lugar su gelificación.

Las muestras se precipitaron con 0,1 volúmenes de ClK al 20% y 2,2 volúmenes de etanol. El precipitado se recoge por centrifugación a 9.000xg durante 10 minutos, resuspendiéndose las muestras en tampón fosfato potásico 10 mM, pH 7, 0,5% de azul de bromofenol y 20% de glicerol. Las muestras fueron calentadas a 50°C durante 5 minutos antes de aplicarlas en el gel.

El tampón de cubetas es fosfato potásico 10 mM pH 7. Dada la baja fuerza iónica del tampón, se hizo circular continuamente entre la cubeta superior y la inferior durante el transcurso de la electroforesis.

La electroforesis se corrió a 150 V hasta que el frente de azul de bromofenol quedó a 6 cm del borde inferior del gel.

El gel se tiñó por inmersión en una disolución de bromuro de etidio (5 μ gr/ml) en acetato amónico 0,1 M durante 30 minutos, localizándose la posición de los ácidos nucleicos por fluorescencia en un transiluminador de luz ultravioleta.

2.12. Obtención de lisados de reticulocitos de conejos

Los experimentos de traducción in vitro de mRNAs se realizaron en un sistema libre de células obtenido a partir de reticulocitos de conejos, según el método descrito por Pelham y Jacob (1976). Para obtener reticulocitos de conejo se inyectó a 5 animales con fenil hidracina, compuesto que induce un proceso de anemia, aumentando los niveles de reticulocitos circulantes. La fenil hidracina se inyectó durante 5 días consecutivos. Se utilizó fenil hidracina al 1,2%, siendo la dosis de 2,5 ml por conejo el primer día, 2 ml el segundo día y 1,5 ml, 2 ml y 2,5 ml los días tercero, cuarto y quinto, respectivamente.

Dos días después de la última inyección se extrajo sangre a los conejos, para ello se punzó la arteria central de la cara dorsal del pabellón auditivo. Se obtuvo una media de 40 ml de sangre por conejo. La sangre de cada conejo se añadió a 50 ml de tampón salino ClNa 0,14 M, acetato de magnesio 1,5 M, ClK 5 mM, al que se había añadido heparina a una concentración del 0,001% (peso/volumen).

La sangre obtenida se centrifugó a 1.500xg durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante de esta centrifugación, lavándose tres veces el precipitado con tampón salino. El último precipitado se resuspendió en un volumen de agua estéril, agitándose la mezcla durante un minuto para conseguir la lisis celular. El lisado se centrifugó a 27.000xg durante 20 minutos, recogiendo el sobrenadante. Este sobrenadante constituye el sistema libre de células y fué conservado a 70°C bajo cero en alícuotas de 0,5 ml.

En el lisado existe una intensa actividad de síntesis proteica dirigida por el mRNA del reticulocito. Para examinar la síntesis de proteínas dirigida por mRNA exógeno hay que degradar previamente el mRNA endógeno del lisado. Esta degradación se consigue tratando al lisado con nucleasa de Micrococcus (30 U/ml), en presencia de hemina 7 mM y Cl₂Ca 1 mM; la reacción se lleva a cabo a 20°C durante 15 minutos. En estas condiciones se degrada específicamente el mRNA, quedando intacto el tRNA y rRNA, necesarios para el proceso de traducción. La reacción se para por adición de EGTA hasta una concentración de 4 mM. El tratamiento con nucleasa se realizó en cada alícuota del lisado inmediatamente antes de su utilización para la traducción. El tratamiento reduce la síntesis de proteínas dirigida por el mRNA endógeno del lisado a menos de un 1% de la síntesis original.

2.13. Ensayo de traducción in vitro de mRNAs

Los ensayos de traducción in vitro se realizaron siguiendo el método descrito por Sierra (1980). La reacción se efectuó en un volumen de 30 μ l, incubándose a 30°C durante el tiempo indicado en cada experimento.

El medio de ensayo para la traducción del RNA del virus TMV contenía: ClK 80 mM, acetato magnésico 3 mM, creatín fosfato 10 mM, creatín fosfokinasa 1 μ gr por ensayo; tRNA de levadura 10 μ gr por ensayo; cada uno de los 20 aminoácidos, excepto la metionina 50 μ M; hemina 20 μ M y 1 μ Ci de 35 S-Metionina de actividad específica 700 Ci/mMol. Se utilizaron 20 μ l de lisado de reticulocitos por ensayo y hasta 4 μ gr de mRNA.

A los tiempos indicados se recogieron alícuotas de 5 μ l de cada tubo de ensayo, añadiéndose sobre un volumen de 0,5 ml de una disolución de metionina 1 mM, NaOH 0,33 M y H₂O₂ 0,16 M. La mezcla se incubó a 37°C durante 15 minutos. Esta incubación tiene por objeto la decoloración de la hemina. Tras los 15 minutos de incubación se añadió un mililitro de ácido tricloroacético al 25%, dejando la mezcla a 4°C durante 15 minutos.

La cantidad de metionina radioactiva incorporada a proteínas se determinó recogiendo el material insoluble en ácido por filtración a través de filtros de lana de vidrio GF/C. Cada filtro fué lavado con 10 ml de ácido tricloroacético al 10%. La radioactividad retenida en los filtros se determinó en un contador de centelleo líquido; para este fin se sumergieron los filtros en una solución de 5,5 gr de Permablend por litro de tolueno.

La actividad del sistema de traducción se comprobó en cada ensayo, utilizando RNA extraído del virus del mosaico del tabaco com mRNA patrón. En cada ensayo se comprobó la actividad de traducción debida al mRNA endógeno del sistema de reticulocitos; esta actividad fué restada de la actividad observada con mRNAs exógenos.

III. RESULTADOS

A.- ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES DE LA POLI(A) POLIMERASA DE LA FRACCION SOLUBLE DE EMBRIONES ENQUISTADOS DE Artemia

1. Purificación del enzima y características del producto de reacción

1.a. Purificación del enzima

La primera parte de esta tesis doctoral está dedicada al estudio de la enzimología de la poliadenilación durante el desarrollo temprano de Artemia. Anteriormente se ha comunicado la existencia de una actividad poli(A) polimerasa en embriones enquistados. La purificación y caracterización de esta actividad constituyó el objeto de la tesis de licenciatura titulada: "Purificación y caracterización de una poli(A) polimerasa en embriones de Artemia salina", presentada en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid (Sastre, 1977).

En la primera parte del presente trabajo se presentan algunos datos que completan los estudios de caracterización expuestos en la tesis de licenciatura.

El proceso de purificación parcial del enzima expuesto en la tesis de licenciatura se ha mejorado mediante la utilización de una etapa de cromatografía de intercambio iónico a través de una columna de Bio Rex 70. El proceso consta de las siguientes etapas: 1) Obtención de la fracción soluble por homogeneización de los quistes en el tampón BL y posterior centrifugación a 105.000 xg durante 2 horas. 2) Cromatografía de intercambio iónico en columna de DEAE-celulosa. 3) Cromatografía de intercambio iónico a través de una columna de Bio Rex 70. 4) Precipitación fraccionada con sulfato amónico, recogiendo la fracción de proteína que precipita entre el 30 y el 45% de saturación. 5) Filtración a través de Sephadex G-150.

Todas estas etapas han sido descritas en la tesis de licenciatura, excepto la cromatografía de intercambio iónico en columnas de Bio Rex 70. Para esta cromatografía se utilizó una columna de 50 ml de Bio Rex 70 equilibrada con tampón BL al que se había añadido ClK 10 mM. La muestra consistió en el conjunto de fracciones de la columna de DEAE-celulosa que tenían actividad poli(A) polimerasa. Una vez pasada la muestra se lavó la columna con 25 ml de tampón BL con ClK 10 mM, aplicándose posteriormente un gradiente de 75x75 ml de tampón BL que contenía ClK de 10 mM hasta 0,5 M. Se recogieron fracciones de 3 ml, en las cuales se determinó la actividad poli(A) polimerasa, así como su absorción a 280 nm y la concentración de ClK presente en cada una de ellas. El resultado de este experimento se muestra en la figura 2.

En la Tabla III se muestra un resumen del proceso de purificación. Con este procedimiento se consigue una purificación de 100 veces, con un rendimiento del 36%.

La utilización de cromatografía de afinidad en columna no ha permitido mejorar la purificación del enzima. La poli(A) polimerasa de quistes de Artemia no se une a columnas de poli(U)-sepharosa, poli(A)-sepharosa, RNA-sepharosa, DNA-celulosa, ni ATP-agarosa en las distintas condiciones de pH, presencia de sustratos (ATP) o metales divalentes (Mn^{2+}) que hemos ensayado.

Dado que el enzima no ha podido ser purificado a homogeneidad, hemos ensayado la presencia de actividades enzimáticas que pudieran interferir con la reacción de la poli(A) polimerasa parcialmente purificada. Hemos podido comprobar que en el enzima parcialmente purificado de quistes no existe actividad ribonucleásica detectable cuando se incubaba el enzima con (^{32}P)-RNA de levadura. Existe una ligera actividad ATPásica, estimada en 3×10^{-5} unidades de actividad por unidad de actividad

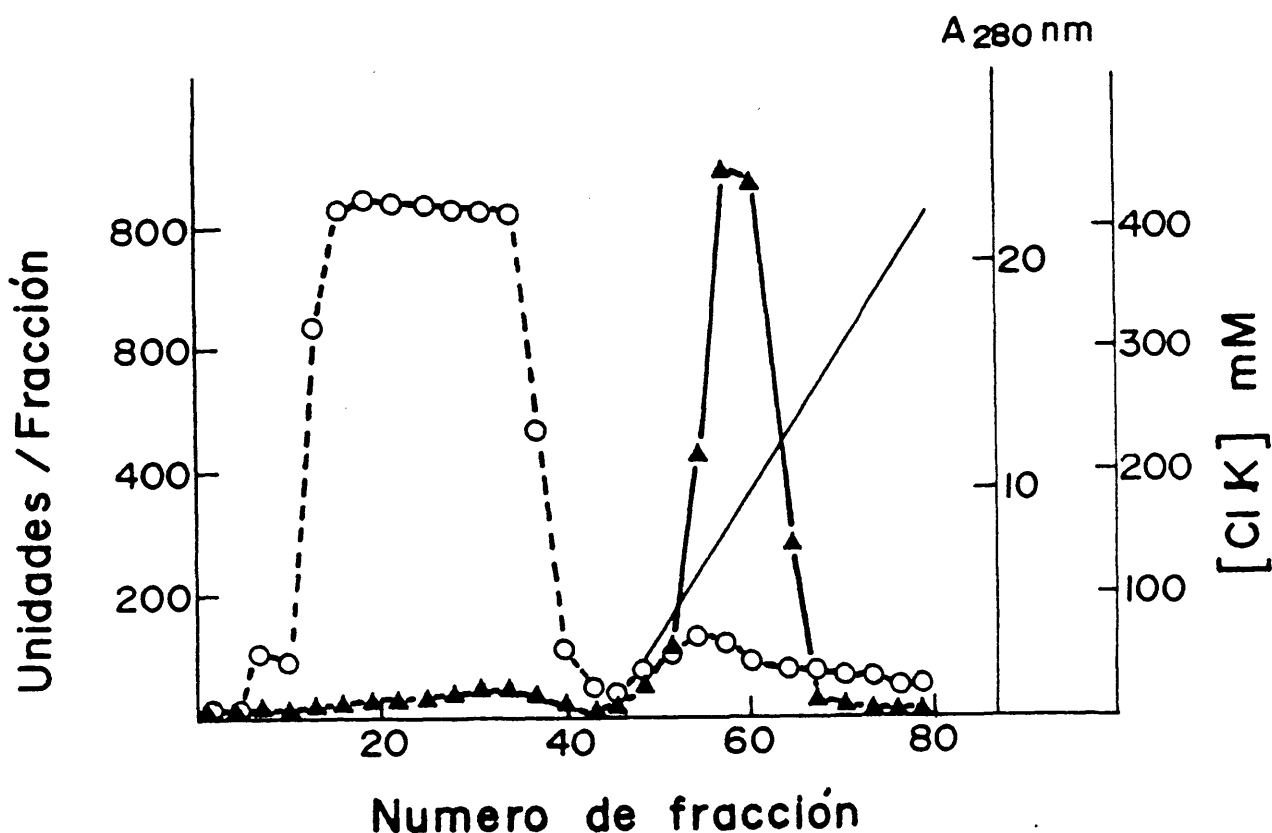


Figura 2. Cromatografía en Bio-Rex 70 de la poli(A) polimerasa de fracciones solubles de embriones enquistados

Las fracciones que contenían actividad poli(A) polimerasa de una cromatografía en DEAE-celulosa fueron sometidas a cromatografía en columna de Bio-Rex 70. Se utilizó una columna de 50 ml. La muestra poseía una concentración de ClK de 10 mM. La columna fué lavada tras la aplicación de la muestra con 25 ml de tampón BL + ClK 10 mM. Se aplicó posteriormente un gradiente de 75 x 75 ml del tampón BL + ClK (10 mM a 0,5 M). Se recogieron fracciones de 3 ml. Se determinó la actividad poli(A) polimerasa en 50 μ l de cada fracción (▲), la absorción a 280 nm (O) y la concentración de ClK (-).

TABLA III. PURIFICACION DE LA POLI(A) POLIMERASA DE LA FRACCION
SOLUBLE DE EMBRIONES DE Artemia

Fracción	Volumen ml	Proteína mg/ml	Actividad		Recuperación %
			unidades x 10 ⁻³	ESPECÍFICA	
			TOTAL	ESPECÍFICA	
1. Fracción soluble	80	20	5,3	3,3	100
2. DEAE-celulosa	28	20	5,9	10,5	111
3. Bio Rex	63	2,4	4,6	30	78
4. Sulfato amónico	1	52	2,5	48	42
5. Sephadex G150	12	0,5	2,1	350	36

poli(A) polimerasa. Esta actividad sería responsable de la degradación de un 4% del ATP de la mezcla de ensayo al cabo de los 30 minutos de incubación en las condiciones de ensayo habituales de la actividad poli(A) polimerasa. La actividad ATPásica del enzima parcialmente purificado representa solamente un 0,6% de la actividad ATPásica presente en la fracción soluble de quistes.

1.b. Unión del producto de reacción al RNA iniciador

En la tesis de licenciatura se estudió la naturaleza del producto resultante de la actividad del enzima purificado. Se pudo demostrar que se trataba de una cadena de ácido poliadenílico en base a una serie de estudios, tales como su resistencia a la acción de las ribonucleásica pancreática y RNasa T₁, siendo en cambio degradada por una ribonucleasa inespecífica purificada a partir de nauplias de Artemia (Sebastián y Heredia, 1978), así como por su capacidad para unirse a columnas de poli(U)-sepharosa. Estos datos, junto con los de especificidad de sustrato, nos permitieron caracterizar al enzima como una poli(A) polimerasa.

En dicha tesis de licenciatura se presentaron también datos indirectos de la unión del producto de reacción al RNA presente en el ensayo, indicando que este RNA actúa como iniciador de la cadena de ácido poliadenílico en la reacción de la poli(A) polimerasa. A continuación se describen resultados que demuestran esta unión.

1.c. Unión covalente del producto de reacción al extremo 3' del RNA iniciador

La demostración se ha realizado mediante dos tipos de abordajes experimentales:

1.c.1. Asociación del producto de reacción al RNA iniciador en gradientes de sacarosa. Para este tipo de experimentos se utilizaron como iniciadores RNAs ribosomales de levaduras. Los rRNAs se incubaron con ³H-ATP y la poli(A) polimerasa durante 30 minutos. En estas condiciones se forman cadenas de unas 10 adenosinas de longitud media, existiendo por tanto una gran diferencia de tamaño entre los iniciadores y el pro-

ducto de reacción. Tras la incubación, iniciadores y producto de reacción se someten a centrifugación a través de un gradiente de sacarosa. Si el producto de reacción no estuviera unido al iniciador, ambos deberían separarse netamente, en cambio, si el producto de reacción está unido al iniciador, ambos migrarán conjuntamente.

Para localizar el rRNA iniciador con mayor exactitud, se utilizó rRNA marcado con ^{32}P ; el marcaje y aislamiento del ^{32}P -rRNA se realizó según se ha indicado en material y métodos. El ^{32}P -rRNA se fraccionó en los diferentes componentes: 26, 18 y 5 S. Dada la cantidad de rRNA necesaria para la reacción enzimática, el rRNA marcado con ^{32}P fué suplementado en los ensayos con rRNA de cada uno de los diferentes especies moleculares sin marcar radioactivamente, purificados también de levadura.

Se realizaron dos experimentos diferentes; en el primero de ellos se incubó la poli(A) polimerasa con rRNA 18 S sin marcar (250 μgr) y una pequeña cantidad (2 μgr) de una mezcla de los tres rRNAs marcados con ^{32}P . Tras 30 minutos de incubación, la reacción se paró por adición de EDTA hasta 5 mM y SDS hasta el 0,1% y se sometió a centrifugación a través de un gradiente de sacarosa del 5 al 20% en tampón TMN con 0,1% de SDS. Se centrifugó durante 20 horas a 24.000 rpm en un rotor SW-27 a 4°C. Se recogieron fracciones de 0,6 ml, las cuales fueron inmediatamente precipitadas con TCA al 5% y pirofosfato tetrasódico al 2%; el precipitado fué recogido en filtros GF/C y la radioactividad de los mismos contada en un contador de centelleo líquido. El resultado del experimento se muestra en la figura 3. La cadena poliadenílica, tritiada, migra en el gradiente junto al rRNA 18 S, marcado con ^{32}P , lo cual se puede atribuir a la unión del producto de reacción al RNA iniciador, puesto que el gradiente se realizó en condiciones desnaturalizantes. Existe una parte del producto de reacción que migra con un coeficiente de sedimentación inferior a 5 S, que puede deberse a la presen-

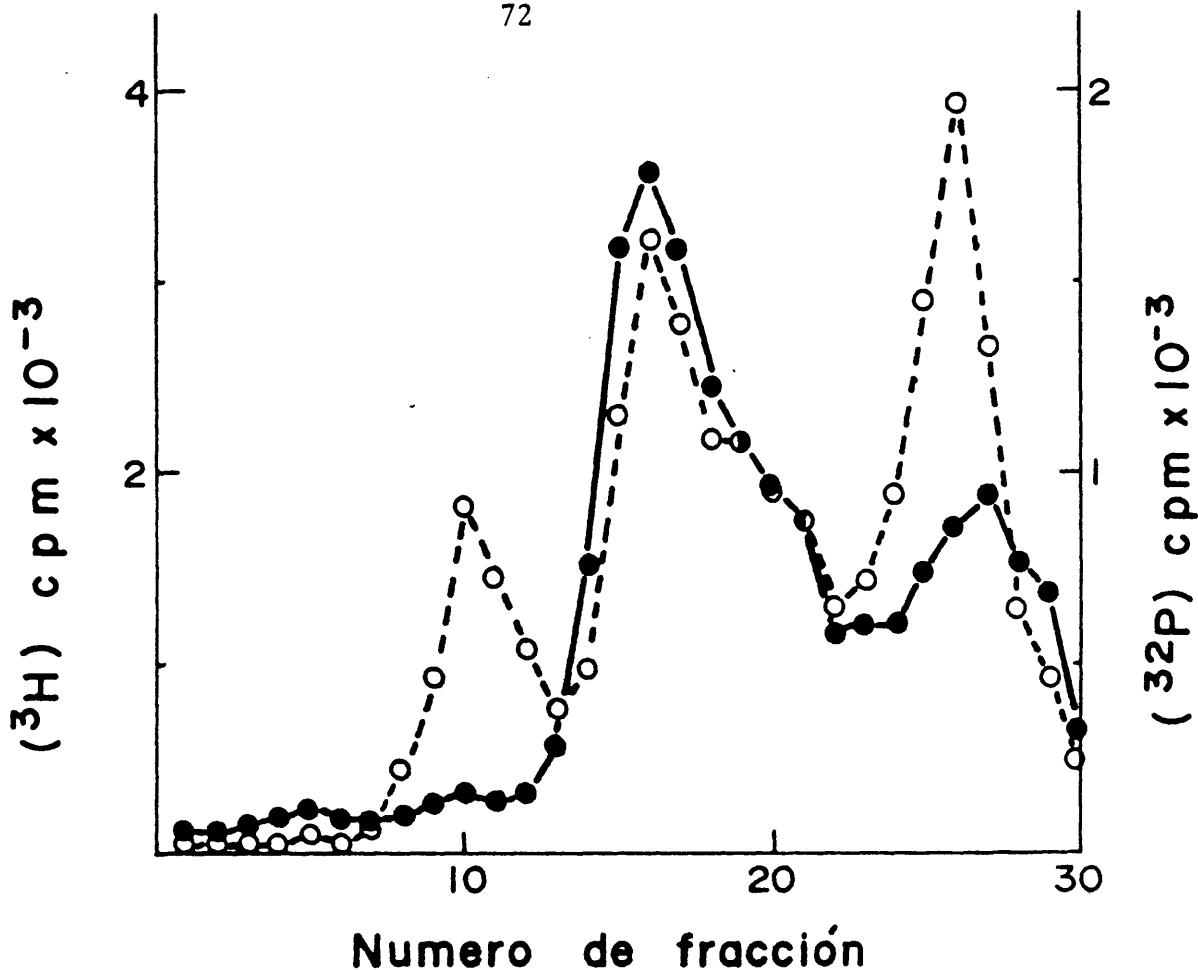


Figura 3. Centrifugación zonal en gradientes de sacarosa del producto de reacción de la poli(A) polimerasa utilizando rRNA 18 S de levadura como iniciador

250 μ g de rRNA 18 S de levadura se incubaron con poli(A) polimerasa en presencia de 6 μ Ci de 3 H-ATP en las condiciones habituales de ensayo durante 30 minutos. Una vez concluida la reacción se añadieron 2 μ g₂ de una mezcla de rRNAs 26, 18 y 5 S de levadura marcados con 32 P (17×10^6 cpm/mg). La mezcla resultante se centrifugó en un gradiente del 5 al 20% de sacarosa en tampón TMN con 0,1% de SDS. La centrifugación se efectuó en un rotor SW 27 a 24.000 rpm, a 2°C durante 20 horas. Se recogieron fracciones de 0,6 ml desde el fondo del gradiente, que fueron precipitadas con ácido tricloroacético. Se determinó la radioactividad incorporada de 3 H (●—●) y la existente de 32 P (○--○) en cada fracción.

cia en la mezcla de ensayo de productos de degradación del 18S rRNA frío sobre los que haya actuado el enzima. Estos productos de degradación no tendrían por qué estar marcados con ^{32}P dada la diferente procedencia de los rRNAs marcado y frío.

En el segundo experimento, la incubación se realizó en presencia de los tres tipos de rRNA: 26 S (23 μg), 18 S (28 μg) y rRNAs de bajo peso molecular (23 μg), tanto fríos como marcados. La reacción se paró como en el experimento anterior y los gradientes fueron centrifugados en forma similar. La radioactividad precipitable por TCA se distribuyó como muestra la figura 4. También en este caso el producto de reacción (tritiado) migra junto con los iniciadores (marcados con ^{32}P), confirmando el resultado del experimento anterior.

Un resultado interesante de este segundo experimento es que la cantidad de ácido poliadenílico formado por unidad de peso de iniciador aumenta a medida que disminuye el tamaño del rRNA iniciador, siendo mayor para los iniciadores de bajo peso molecular, luego para el 18 S y menor para el rRNA 26 S. Se ha calculado la longitud de la cadena poliadenílica sintetizada sobre cada uno de los rRNAs mediante el método descrito en Material y Métodos. Los resultados fueron: longitud media usando 26 S rRNA: 13 adenosinas, con 18 S rRNA: 8,5 y con 5 S rRNA: 5. De estos datos pueden obtenerse dos conclusiones: a) La actividad de la poli(A) polimerasa sobre rRNAs es proporcional al número de extremos 3' libres, el cual es mayor, por unidad de peso, cuanto menor es la longitud del rRNA, y b) la longitud de la cadena poliadenílica sintetizada es mayor cuanto menor es la concentración de cadenas de RNA iniciador. Este resultado está de acuerdo con lo descrito por Winters y Edmonds (1973 b).

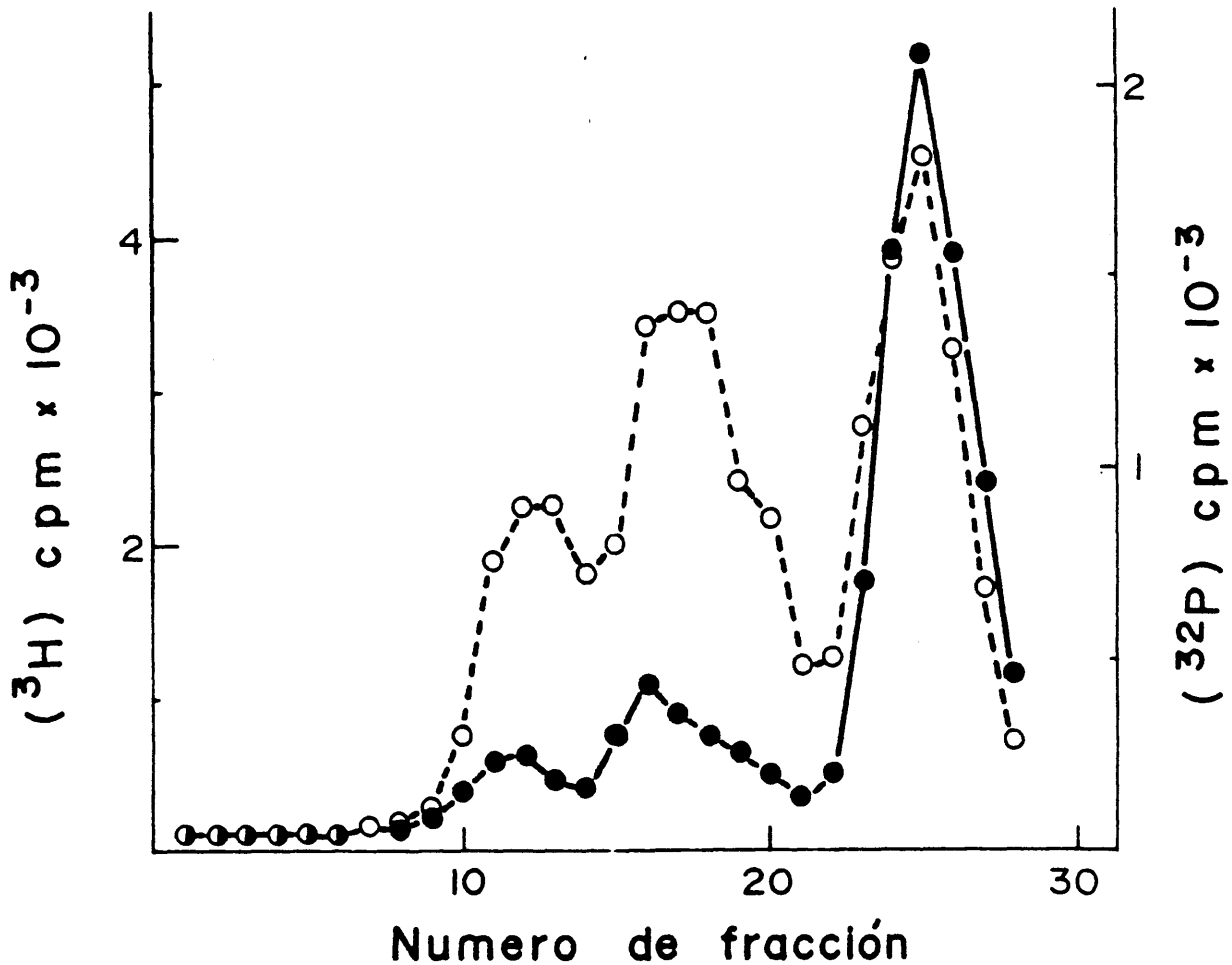


Figura 4: Centrifugación zonal en gradientes de sacarosa del producto de la reacción de la poli(A) polimerasa utilizando rRNA 26, 18 y 5 S de levadura como iniciadores

23 μg de rRNA 26 S, 28 μg de rRNA 18 S y 23 μg de rRNA 5 S, junto con 2 μg de una mezcla equimolecular de los tres rRNAs marcados con ^{32}P (17×10^6 cpm/mg) fueron poliadenilados en las condiciones habituales de ensayo en presencia de 6 μCi de ^3H -ATP. La mezcla de ensayo se incubó 30 min. a 30°C y se sometió a centrifugación zonal en gradientes de sacarosa del 5 al 20% en tampón TMN con 0,1% SDS. La centrifugación se efectuó en el rotor SW 27 a 24.000 rpm, 20 horas a 2°C . Se recogieron fracciones de 0,6 ml desde el fondo del gradiente que fueron precipitadas con ácido tricloroacético. La radioactividad de ^{32}P (○--○) y de ^3H (●—●) fué determinada en cada fracción.

1.c.2. Transferencia del ^{32}P en posición α del α (^{32}P)-ATP al nucleósido en posición 3' terminal del RNA iniciador, tras la hidrólisis alcalina del producto de reacción. El planteamiento teórico de este experimento es el siguiente: se incubaba la poli(A) polimerasa en presencia de poli(G) como RNA iniciador y ATP marcado con ^{32}P en posición alfa.

En el caso en el que el enzima una covalentemente la cadena poliadenílica que sintetiza al extremo 3' del RNA iniciador, la unión se realizará a través de un enlace entre el fosfato en α del ATP sustrato de la reacción y el carbono en posición 3' del nucleósido 3' terminal del iniciador. En consecuencia, el fosfato entre el nucleósido 3' terminal del iniciador y la primera adenosina de la cadena poliadenílica estará marcado. Una vez realizada esta unión, se somete el producto de reacción a hidrólisis alcalina. En estas condiciones se rompe la unión entre el nucleósido 3' terminal del iniciador y la primera adenosina de la cadena poliadenílica por el enlace entre el fosfato y el carbono 5' de la primera adenosina de la cadena. La consecuencia es que el fosfato que unía a estos dos nucleósidos, que procedía del ATP, queda unido al nucleósido 3' terminal del iniciador. En caso de que la poli(A) polimerasa no uniera covalentemente la cadena poliadenílica al extremo 3' del iniciador, la transferencia de fosfato radioactivo no ocurriría.

El experimento realizado fué el siguiente: se incubó la poli(A) polimerasa en las condiciones de ensayo habituales, utilizando α (^{32}P)-ATP como sustrato y poli(G) como iniciador en un volumen de ensayo de 0,35 ml. La reacción se incubó a 30°C durante 60 minutos. A cabo de este tiempo la mezcla de ensayo se pasó a través de una columna de Sephadex G-25 con el fin de separar el producto de la reacción del sustrato. Las fracciones de la columna que contenían el producto de reacción se precipitaron con 0,1 volúmenes de acetato potásico al 20% y 2,2 volúme-

nes de etanol, manteniéndolas a -20°C toda la noche. Las fracciones precipitadas fueron resuspendidas en $50\ \mu\text{l}$ de $\text{KOH}\ 0,3\ \text{N}$ e incubadas a 37°C durante 18 horas para que tuviera lugar la hidrólisis alcalina. Posteriormente las fracciones fueron neutralizadas con ClH , procediéndose a separar el AMP del GMP presentes en las mismas. La separación se realizó por dos métodos: electroforesis de alto voltaje y cromatografía en PEI-celulosa, utilizando como eluyente formiato amónico $0,5\ \text{M}$ pH 3,5.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla IV. Se observa una transferencia de fosfato radioactivo del sustrato a nucleósidos del iniciador. Como ya hemos explicado, esta transferencia sólo es posible si la poli(A) polimerasa une covalentemente la cadena poliadenílica que sintetiza al extremo $3'$ del RNA iniciador, quedando por tanto demostrada esta hipótesis.

De los datos obtenidos en este experimento se puede calcular la longitud de la cadena poliadenílica sintetizada por el enzima. Este cálculo se basa en el siguiente hecho: cada molécula de ATP incorporada por el enzima transfiere su fosfato en posición α al nucleósido al cual se ha unido. Si consideramos una cadena poliadenílica unida a su correspondiente iniciador, solamente el AMP incorporado en primer lugar transfiere su fosfato a un nucleósido componente del iniciador, todos los demás lo transfieren a la adenosina que había sido incorporada inmediatamente antes. Por lo tanto, la relación entre la radioactividad presente en cualquier nucleótido (AMP + GMP) y la presente en GMP después de la hidrólisis alcalina nos dará el valor de la longitud de la cadena poliadenílica.

Como control del experimento se había efectuado un ensayo paralelo en el cual se había empleado como sustrato $(^3\text{H})\text{-ATP}$. El producto de esta reacción se sometió también a hidrólisis alcalina. En los productos de la hidrólisis se cuantificó la ra-

radioactividad presente como adenosina y como AMP, utilizándose estos datos para calcular la longitud de la cadena poliadenílica sintetizada, según el procedimiento descrito en Material y Métodos.

TABLA IV. ANALISIS DE LA UNION COVALENTE DE LA CADENA
DE POLI(A) AL RNA INICIADOR

Producto de la <u>hidrólisis alcalina</u>	Método de separación		
	<u>Cromatografía</u> CPM	<u>Electroforesis</u> CPM	<u>Cromatografía</u> CPM
GMP	21150	6314	-
AMP	78834	27537	17533
Adenosina	-	-	3369
<hr/>			
longitud media	5	5	6

En la Tabla IV se muestran las longitudes calculadas a partir de los datos obtenidos con los dos métodos de separación de nucleótidos en la incubación con α (^{32}P)-ATP y en la incubación con (^3H)ATP. Las 3 longitudes son similares, lo que confirma la validez del experimento realizado con α (^{32}P)ATP. La longitud obtenida utilizando poli(G) como iniciador es del mismo orden de las que se describió en la tesis de licenciatura cuando los iniciadores eran RNA de Tórula y poli(A).

2. Características moleculares de la poli(A) polimerasa

2.a. Peso molecular

Se ha calculado el peso molecular de la poli(A) polimerasa de la fracción soluble de quistes de Artemia por gel filtración en columnas de Sephadex G-150. Para ello se utilizó la fracción de proteína que precipita entre el 30 y el 45% de saturación de sulfato amónico de las fracciones con actividad poli(A) polimerasa retenida en una columna de DEAE-celulosa. La actividad poli(A) polimerasa de esta fracción eluye de la columna de Sephadex G-150 con un volumen de tampón que es 1,35 veces el volumen vacío de la columna.

Para calcular el peso molecular del enzima, la columna de Sephadex G-150 se calibró con las siguientes proteínas: fosfatasa alcalina de intestino bovino (PM, 100.000), seroalbúmina bovina (PM, 68.000), α -amilasa de Aspergillus orizae (PM, 51.000) e inhibidor de la tripsina de soja (PM, 16.000). La fosfatasa alcalina fué localizada por determinación de su actividad enzimática y los otros tres patrones por absorción óptica a 280 nm. Cuando se representa el cociente del volumen de elución de cada proteína dividido por el volumen vacío de la columna respecto al logaritmo decimal del peso molecular de la pro-

teína, la relación es lineal, como se ve en la figura 5. A partir de esta recta patrón se puede interpolar el peso molecular de la poli(A) polimerasa, que resulta ser de 70.000.

Este peso molecular es muy parecido al descrito en los siguientes sistemas: mitocondrias de hepatomas poco diferenciado, cuyo peso molecular es 60.000 (Rose y col., 1975); isoenzima citoplásmico de células Hela, 75.000 (Nevins y Joklik, 1977) y embriones de rata, 65.000 (Hadidi y Sethi, 1976). Diferenciando con respecto a las poli(A) polimerasas descritas en levadura, cuyo peso molecular es 100.000 (Hoff y Keller, 1973); e isoenzima nuclear de células Hela, 50.000 (Nevins y Joklik, 1977).

2.b. Punto isoeléctrico

El punto isoeléctrico se determinó por isoelectroenfoque en columna, siguiendo el método descrito por la casa Pharmacia utilizando una columna Pharmacia, modelo GM-1.

El isoelectroenfoque se realizó en el seno de un gradiente de sacarosa del 5 al 50% (peso/volumen) con un volumen total de 105 ml, al cual se le añadió un 2,5% (volumen/volumen) de anfolito, cubriendo un rango de pH de 3 a 10.

En este tipo de columnas el electrodo positivo está situado en la parte inferior de la columna, rodeado de una solución de sacarosa al 55% (peso/volumen) y ácido fosfórico 36 mM. Sobre la disolución que rodea al electrodo positivo va el gradiente de sacarosa con el anfolito. Sobre el gradiente de sacarosa está situado el electrodo negativo, rodeado a su vez de una disolución de trietilamina 20 mM.

La muestra consistió en 2 ml de la fracción soluble del extracto de quistes en tampón BL, a los que se añadieron 2 ml de la solución densa del gradiente de sacarosa. La muestra fué

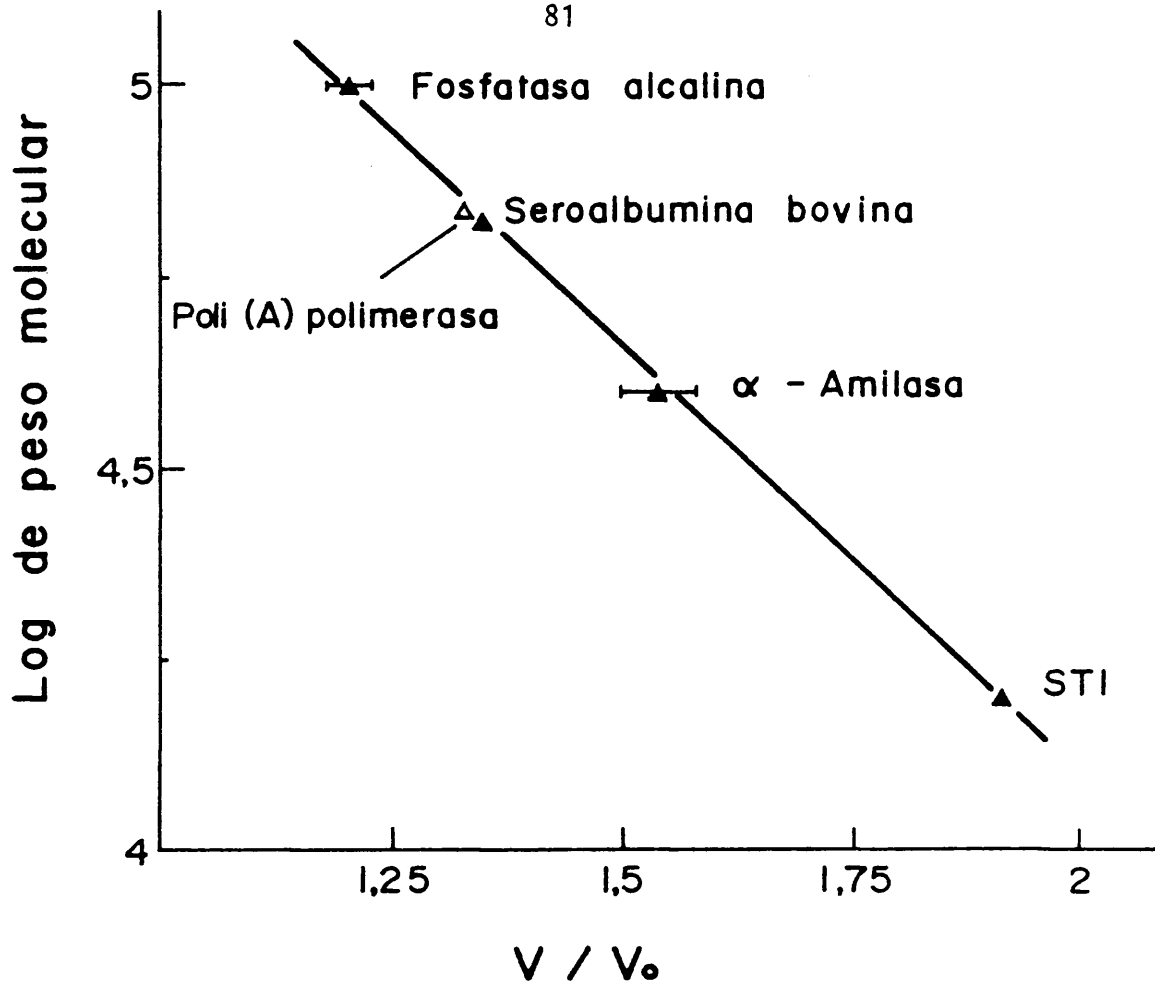


Figura 5. Cálculo del peso molecular de la poli(A) polimerasa de embriones enquistados por gel filtración

El peso molecular de la poli(A) polimerasa se estimó por su migración en una columna de Sephadex G-150. Se utilizaron como proteínas patrones la fosfatasa alcalina de intestino bovino (PM: 100.000), la seroalbúmina bovina (PM: 68.000), la α -amilasa de Aspergillus orizae (PM: 51.000) y el inhibidor de la tripsina de la soja (PM: 16.000). La posición de la fosfatasa alcalina se determinó por su actividad enzimática y la de las otras proteínas marcadoras por absorción óptica a 280 nm.

aplicada en la zona central del gradiente de sacarosa; para ello se esperó a que se hubiera formado la mitad del gradiente en la columna de isoelectroenfoco y en ese momento se añadió la muestra, al tiempo que seguía formándose el gradiente. La muestra, que es coloreada, queda formando un anillo en el centro de la columna de isoelectroenfoco. El motivo de aplicar la muestra en el centro de la columna es que durante el isoelectroenfoco lo primero que se forma es un gradiente de pH a lo largo de la columna, que va de 3 a 10. Si la muestra se aplicara en la parte inferior o superior de la columna, quedaría temporalmente sometida a un pH de 3 ó de 10 que inactivaría el enzima.

Se aplicó una diferencia de potencial de 1.200 V durante 60 horas para lograr la formación del gradiente de pH y la migración de las proteínas hasta el pH al que cada una consigue la neutralidad eléctrica. Para evitar la elevación de la temperatura originada por la gran resistencia eléctrica de la columna, se utilizó una doble capa de refrigeración, por las partes interna y externa del gradiente de sacarosa, por las cuales se hizo circular agua a 2^a C de forma continua durante las 60 horas.

Una vez que había finalizado la migración de las proteínas se procedió a fraccionar la columna; para ello se extrajo por la parte inferior, recogiendo fracciones de 1,5 ml. En cada fracción se procedió a medir el % de sacarosa, pH, absorción óptica a 280 nm y actividad poli(A) polimerasa.

Previamente se había comprobado que la presencia de anfilitos en la mezcla de ensayo no afecta a la actividad poli(A) polimerasa. Igualmente se había estudiado que la presencia de anfilitos tampoco afecta a la estabilidad del enzima.

El resultado del isoelectroenfoco se muestra en la figura 6. La poli(A) polimerasa posee un punto isoeléctrico de aproxi-

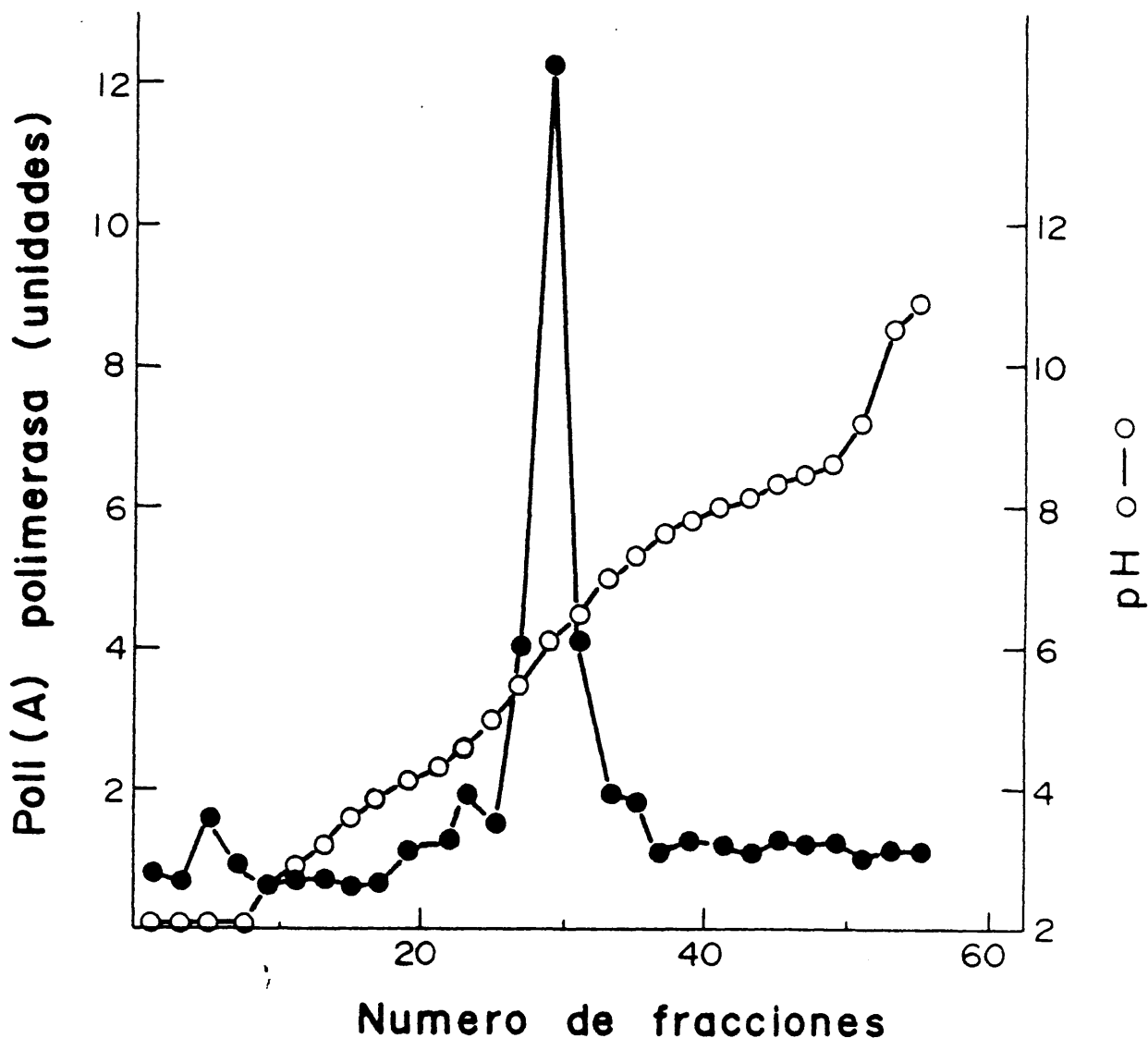


Figura 6. Determinación del punto isoeléctrico de la poli(A) polimerasa de la fracción soluble de embriones enquistados

La fracción soluble (2 ml) de un homogenado de embriones enquistados se sometió a isoelectroenfoque en una columna de 105 ml. El lecho consistió en un gradiente de sacarosa del 5 al 50%. Se utilizó una concentración del 2,5% de anfólito de pH 3 - 10. La columna se sometió a una diferencia de potencial de 1.200 V durante 60 horas, manteniéndola a 0°C. La columna fué fraccionada por la parte inferior, recogiendo fracciones de 1,5 ml. En cada fracción se determinó el pH (○) y la actividad poli(A) polimerasa en alícuotas de 50 μ l (●).

madamente 6, aparece como un pico directo y simétrico de actividad, por lo que no parece que existan 2 ó más poli(A) polimerasa con diferente punto isoeléctrico en los extractos solubles de quistes.

En la literatura no hemos encontrado referencias del punto isoeléctrico de las poli(A) polimerasas de otros sistemas, por lo que no podemos hacer ningún estudio comparativo con respecto a esta propiedad del enzima.

3. Propiedades cinéticas y de especificidad de la poli(A) polimerasa

La comprensión del papel fisiológico que desempeña un enzima requiere el conocimiento de las propiedades enzimáticas tales como la especificidad para los sustratos o las posibilidades de regulación de su actividad por diferentes efectores. Por esta razón se han realizado una serie de estudios de las propiedades cinéticas y de especificidad del enzima. Todos estos estudios se han realizado con poli(A) polimerasa parcialmente purificada por el procedimiento descrito en el apartado 1.b.

3.a. Variación de la velocidad de reacción con la cantidad de enzima

Se ha ensayado la actividad poli(A) polimerasa con cantidades crecientes de enzima parcialmente purificado. El resultado se muestra en la figura 7. No hay una relación estrictamente proporcional entre la actividad y la cantidad de enzima. Este resultado se obtiene también cuando se utiliza poli(A) como iniciador.

La falta de linealidad entre la cantidad de enzima y la

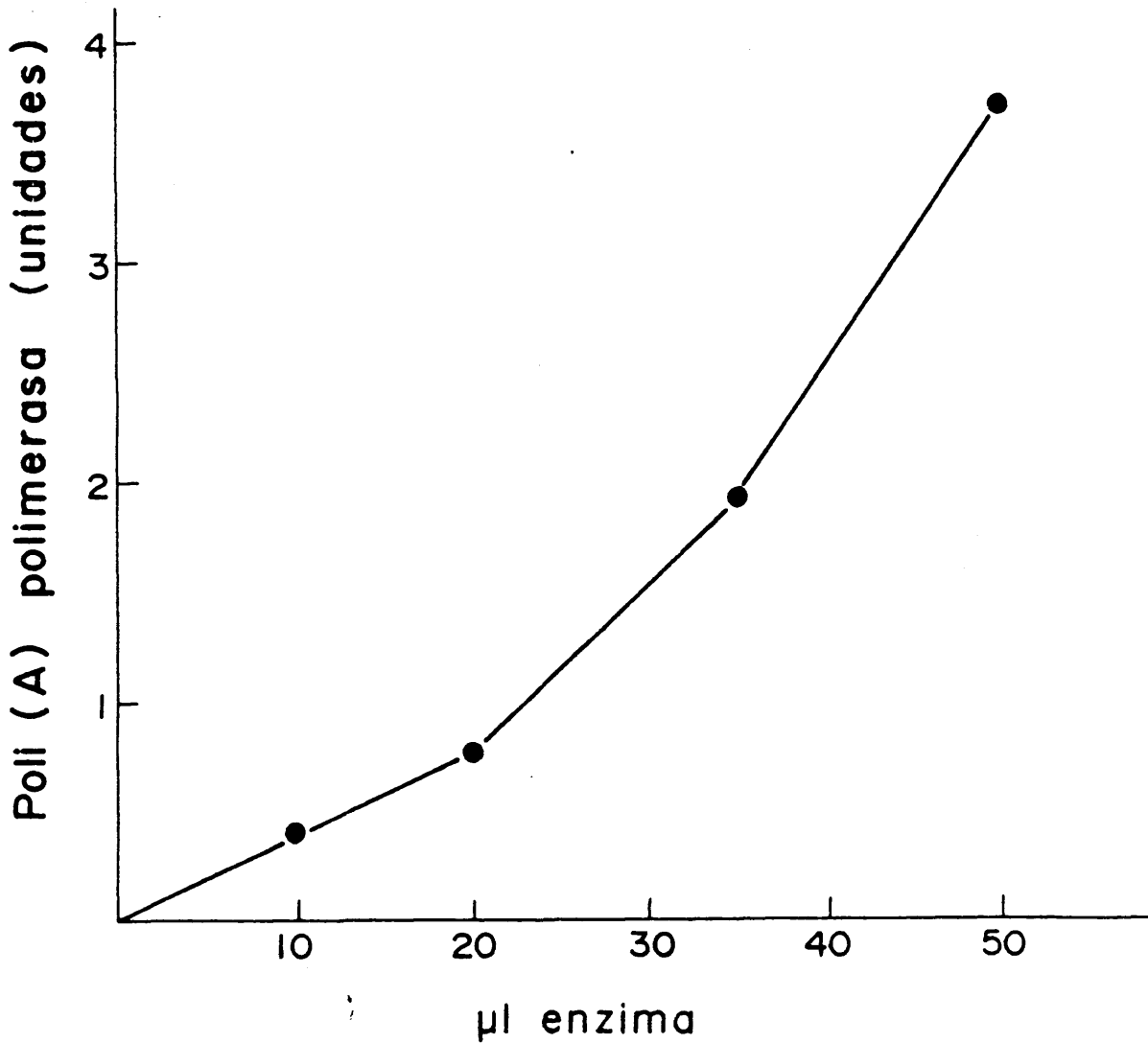


Figura 7. Efecto de la cantidad de poli(A) polimerasa sobre la velocidad de reacción

Se ensayaron diferentes cantidades de enzima parcialmente purificado de la fracción soluble de embriones enquistados. Las condiciones de ensayo fueron las descritas en el apartado de Material y Métodos y la duración fué de 30 minutos. La concentración de proteína de la preparación enzimática fué de 6 mg/ml.

actividad enzimática se observa solamente en preparaciones parcialmente purificadas de enzima. Por esta razón pensamos que podría ser un efecto producido por la baja concentración de proteína en las preparaciones más purificadas. Se ha estudiado el efecto de la adición de seroalbúmina bovina en la mezcla de ensayo sobre la relación entre la cantidad de enzima y la actividad. En este experimento se incubaron diversas cantidades de enzima parcialmente purificado en dos series de reacciones. En las reacciones de una de las series se añadieron las cantidades de seroalbúmina bovina necesarias para que la concentración de proteínas fuera la misma en todos los ensayos. El resultado de ambas series se muestra en la figura 8. La adición de seroalbúmina bovina no afecta a la actividad del enzima.

La no linealidad entre la cantidad de poli(A) polimerasa y la actividad enzimática ha sido descrita también por Winters y Edmonds para la poli(A) polimerasa de timo de ternera (1973 a); Rose y Jacob (1976) para el enzima de hígado de rata; y Rose y col. (1975) para el enzima mitocondrial de hepatoma poco diferenciado de rata. En estos casos la adición de seroalbúmina bovina tampoco afecta a la actividad del enzima.

3.b. Variación de la actividad enzimática con el tiempo de incubación

Se ha estudiado la actividad de la poli(A) polimerasa a lo largo del tiempo de incubación. Se incubaron diversos tubos de ensayo con la misma cantidad de enzima y se paró la reacción a diversos tiempos. En otros casos se realizó la incubación en un único tubo de ensayo, del que se tomaron alícuotas a diferentes tiempos. Los resultados fueron idénticos en ambos casos. La figura 9 muestra la cinética de la reacción enzimática utilizando dos iniciadores: RNA de Tórula y poli(A).

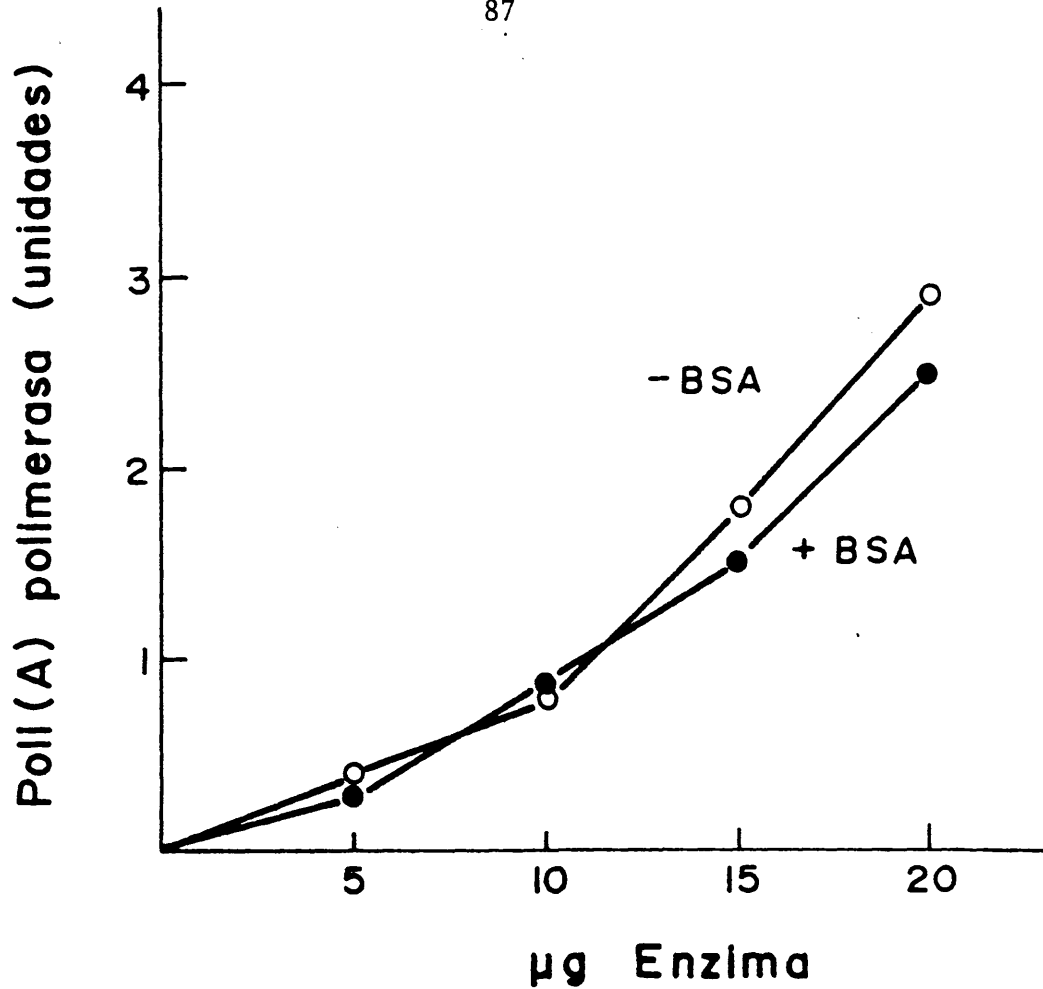


Figura 8. Relación entre la cantidad de proteína y la actividad de la poli(A) polimerasa

Diferentes cantidades de poli(A) polimerasa parcialmente purificada se incubaron en presencia de cantidades de seroalbúmina bovina (BSA) para que la concentración de proteína fuera similar en todos los ensayos (●) y sin adición de BSA (○).

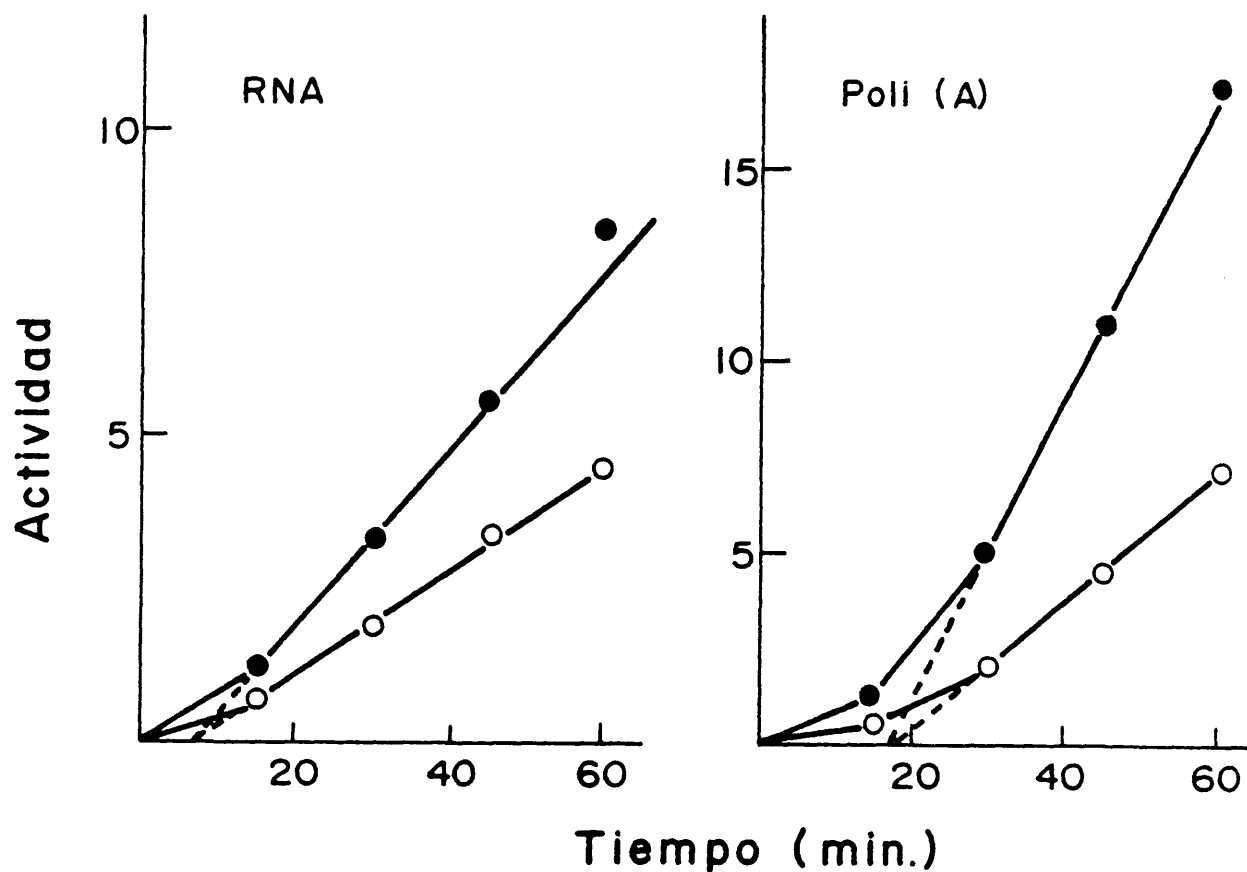


Figura 9. Cinética de la reacción de la poli(A) polimerasa con respecto al tiempo de incubación

Diversas mezclas de ensayo se incubaron en las condiciones descritas en Material y Métodos durante diferentes tiempos. En el panel izquierdo se utilizó RNA de Tórula como RNA iniciador y en el panel derecho se utilizó ácido poliadenílico. En ambos casos se ensayaron dos cantidades diferentes de enzima parcialmente purificado, 30 μ l (○) y 50 μ l (●).

La reacción no es lineal durante los primeros minutos, existiendo una fase inicial de latencia tras la cual la velocidad de la reacción se hace constante durante, al menos, 90 minutos. La duración del período de latencia depende del iniciador; es de unos 5 minutos con RNA de Tórula y de unos 15 minutos con poli(A) como iniciador.

Se investigó si el período de latencia desaparecía si se preincubaba el enzima. Para ello se incubó el enzima a 30°C durante 30 minutos en presencia del iniciador, con o sin manganeso, o en presencia de ATP con o sin manganeso. En todos los casos esta preincubación se realizó en tampón Tris-ClH 50 mM pH 8,5. Tras los 30 minutos de preincubación se añadieron los componentes de la mezcla de ensayo que faltaban en cada caso y se procedió a incubar la reacción enzimática, tomando alícuotas a diversos tiempos para estudiar la cinética de la reacción. En ninguno de los casos la preincubación modificó la cinética, encontrándose un período de latencia en todos los casos.

Tampoco la cantidad de enzima presente en el ensayo afecta al período de latencia. La figura 9 muestra la actividad del enzima durante el tiempo de ensayo con varias cantidades de enzima y utilizando dos iniciadores diferentes, RNA de Tórula y poli(A). Este experimento indica que el período de latencia no depende de la cantidad de enzima y por tanto es un fenómeno diferente de la falta de linealidad entre la actividad enzimática y la cantidad de enzima. De hecho, si se representa la velocidad de reacción, una vez que se ha hecho constante, con respecto a la cantidad de enzima presente en el ensayo, la relación no es lineal, sino del mismo tipo que la que se ha presentado sobre actividad a los 30 minutos de incubación.

La existencia de un período de latencia ha sido descrita para las poli(A) polimerasas de distintos sistemas animales (Winters y Edmonds, 1973 a; Rose y Jacob, 1976; Slater y col., 1978).

3.c. Especificidad de sustrato de la poli(A) polimerasa

La Tabla V muestra un resumen de los estudios que se describieron en la tesis de licenciatura sobre la especificidad de la poli(A) polimerasa para distintos RNAs iniciadores. Uno de los resultados más interesantes de esta tabla es la diferencia entre la capacidad del poli(A) para actuar como iniciador comparada con otros ribohomopolímeros como el poli(C), poli(G) y poli(U).

Estos resultados sugieren la posibilidad de que la poli(A) polimerasa tenga distinta capacidad para actuar sobre moléculas de RNA iniciadores que difieren en su nucleósido 3' terminal. Para aclarar este aspecto de la especificidad del enzima se estudió la actividad del enzima con moléculas de RNA iniciador con diferentes nucleósidos 3' terminal.

3.c.1. Especificidad de la poli(A) polimerasa para el nucleótido en posición 3' terminal del RNA iniciador

La base teórica y experimental de este estudio es muy similar a la del apartado 1.b. del estudio de la unión covalente de la cadena poliadenílica al RNA iniciador.

El problema planteado es conocer si la poli(A) polimerasa tiene mayor actividad con cadenas de RNA iniciador que posean un nucleótido determinado en posición 3' terminal o su actividad es independiente de la naturaleza de este nucleótido.

El protocolo experimental consiste en usar α (^{32}P)ATP como sustrato de la poli(A) polimerasa y someter el producto de

TABLA V. ESPECIFICIDAD DE LA POLI(A) POLIMERASA PARA EL RNA INICIADOR

RNA iniciador	Actividad (pmoles AMP incorporados)	% Actividad
rRNA de <u>Artemia</u>	641	100
RNA de <u>Tórula</u>	288	45
Poli(A)	270	42
Poli(C)	26	4
Poli(G)	39	6
Poli(U)	6	1
Poli(AG)	256	40
Poli(AU)	122	19
Poli(GU)	147	23
Poli(CU)	32	5
Poli(IC)	13	2
Poli(A)-poli(U)	51	8
DNA de cadena simple	3	< 1
DNA de doble cadena	3	< 1

reacción a hidrólisis alcalina. Tras la hidrólisis parte del ^{32}P se ha transferido al nucleótido en posición 3' terminal de cada una de las moléculas de RNA iniciador poliadeniladas. De esta manera se puede conocer la especificidad del enzima por este nucleótido.

Una mezcla de ensayo de poli(A) polimerasa en 0,25 ml con RNA de Tórula como iniciador y $\alpha(^{32}\text{P})\text{ATP}$ como sustrato se incubó durante 60 minutos a 30°C. La mezcla de ensayo se filtró por una columna de Sephadex G-25 para separar el sustrato del producto de reacción. Los tubos conteniendo el producto de reacción se precipitaron con 0,1 volúmenes de acetato sódico al 20% y 2,5 volúmenes de etanol. Los tubos se mantuvieron a -20°C un mínimo de tres horas. El precipitado se sedimentó por centrifugación y se resuspendió en 50 μl de KOH 0,3 N, incubándose a 37°C durante 18 horas para que tuviera lugar la hidrólisis alcalina.

Las mezclas de hidrólisis se neutralizaron con ClH para proceder a separar los cuatro nucleósidos 2' ó 3' monofosfato originados en la hidrólisis. Esta separación se realizó por dos métodos diferentes: cromatografía bidimensional en ClLi 1M y ácido acético 0,1 M y electroforesis de alto voltaje, ambos descritos en Material y Métodos. Tras la separación, la placa de cromatografía y el papel de electroforesis fueron cortados en tiras transversales y se cuantificó la radioactividad presente en cada uno de las cuatro nucleósido 2' ó 3' monofosfato.

Al igual que en el experimento de unión de la cadena poliadenílica al iniciador, se realizó en paralelo un ensayo con $^3\text{H-ATP}$ para calcular la longitud de la cadena poliadenílica sintetizada, dato usado como control en el experimento con $\alpha(^{32}\text{P})\text{ATP}$. En este caso hay una dificultad para calcular la radioactividad transferida del ATP al extremo 3' del RNA iniciador

cuando el iniciador tiene una adenina en su posición 3' terminal. En este caso el ^{32}P transferido al iniciador aparece como AMP, siendo, por tanto, indistinguible de la radioactividad procedente de los fosfato internos de la cadena poliadenílica. Para superar este problema hemos supuesto que la proporción de moléculas de iniciador poliadenilado por el enzima cuya base 3' terminal fuera adenina es la media de la proporción de moléculas acabadas en citosina, guanina o uracilo. Según esta hipótesis, la radioactividad transferida a las adenosinas 3' terminales del iniciador será la media de la radioactividad transferida a CMP, GMP y UMP, pudiéndose calcular la longitud de la cadena poliadenílica.

En la Tabla VI se muestra la radioactividad presente en cada nucleósido 2' ó 3' monofosfato, siendo la media de los datos obtenidos por los dos procedimientos de separación de los nucleótidos. Se muestra también la longitud de la cadena poliadenílica calculada a partir de los ensayos con $\alpha(^{32}\text{P})\text{ATP}$ y $^3\text{H-ATP}$. La primera conclusión que podemos sacar es que aparece radioactividad de ^{32}P transferida a CMP, GMP y UMP, es decir, el enzima emplea moléculas de RNA iniciador con los cuatro nucleótidos en posición 3' terminal, y lo hace con una frecuencia muy parecida para cada uno de ellos. La longitud de la cadena estimada a partir de los datos obtenidos con $\alpha(^{32}\text{P})\text{ATP}$ es similar a la longitud de la cadena calculada por incorporación de $^3\text{H-ATP}$. En consecuencia, la hipótesis asumida para hacer el cálculo de la longitud a partir de los datos obtenidos con $\alpha(^{32}\text{P})\text{ATP}$ puede darse por válida.

La conclusión global que se puede obtener es que la poli(A) polimerasa de la fracción soluble no tiene una marcada especificidad por la base presente en el nucleótido 3' terminal del RNA iniciador. La baja actividad que presenta el enzima cuando utiliza ribohomopolímeros como iniciador no debe ser consecuencia de la especificidad del enzima para la base 3' terminal sino que

TABLA VI. ESPECIFICIDAD DE LA POLI(A) POLIMERASA POR LA BASE DEL NUCLEOTIDO 3' TERMINAL DEL RNA INICIADOR

Producto de la hidrólisis alcalina	Sustrato de la poli(A) polimerasa	
	H^3 -ATP CPM	αP^{32} -ATP CPM
AMP	83359	202408
CMP	-	5516
GMP	-	13365
UMP	-	10796
adenosina	15182	-
tamaño medio de la cadena	6,5	6,1

puede deberse a las propiedades de los propios ribohomopolímeros, muy ricos en estructura secundaria y terciaria.

3.c.2. Especificidad del enzima para el nucleótido sustrato de la poli(A) polimerasa

Estos estudios se realizaron sustituyendo el ATP por otros nucleótidos en la mezcla de ensayo descrita en Material y Métodos. La concentración de nucleótido fué de 0,12 mM y su actividad específica similar a la del ATP en todos los casos. Todos los nucleótidos estaban marcados con tritio salvo el ITP, que estaba marcado con ^{14}C . Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla VII.

La preparación de poli(A) polimerasa tiene actividad significativa sólo con dos nucleótidos, el ATP y el dATP, siendo la actividad cinco veces mayor con el primero que con el segundo.

El hecho de que no tenga actividad con CTP, GTP o UTP demuestra que el enzima no es una ribohomopolímero polimerasa (Niessing y Sekerin, 1974). Asimismo, el que no tenga actividad con CTP, ni siquiera en presencia de ATP, indica que no es una RNA-terminal nucleotidil transferasa (Schofield y Williams, 1979). Es también de destacar la falta de actividad con dGTP, lo que permite descartar que la incorporación de dATP puede deberse a una actividad DNA polimerasa contaminante.

Por otra parte, la actividad relativa del enzima con ATP y dATP permanece constante a lo largo del proceso de purificación del enzima, y ambos sustratos compiten entre sí para su incorporación enzimática. En la figura 10 se muestra la representación de Lineweaver-Burke para la inhibición, tanto del ATP sobre la incorporación de dATP, como del dATP para la incorporación de ATP. Como puede comprobarse, ambos sustratos inhiben

TABLA VII. ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO DE LA POLI(A) POLIMERASA

Nucleótido	Nucleótido marcado	Actividad (pmoles nucleótido incorporado)	% Actividad
ATP	ATP	245	100
CTP	CTP	6.5	3
ATP + CTP	CTP	6	3
GTP	GTP	7	3
UTP	UTP	6	3
ITP	ITP	< 2	< 1
dATP	dATP	44	18
dGTP	dGTP	< 2	< 1
ADP	ADP	< 2	< 1

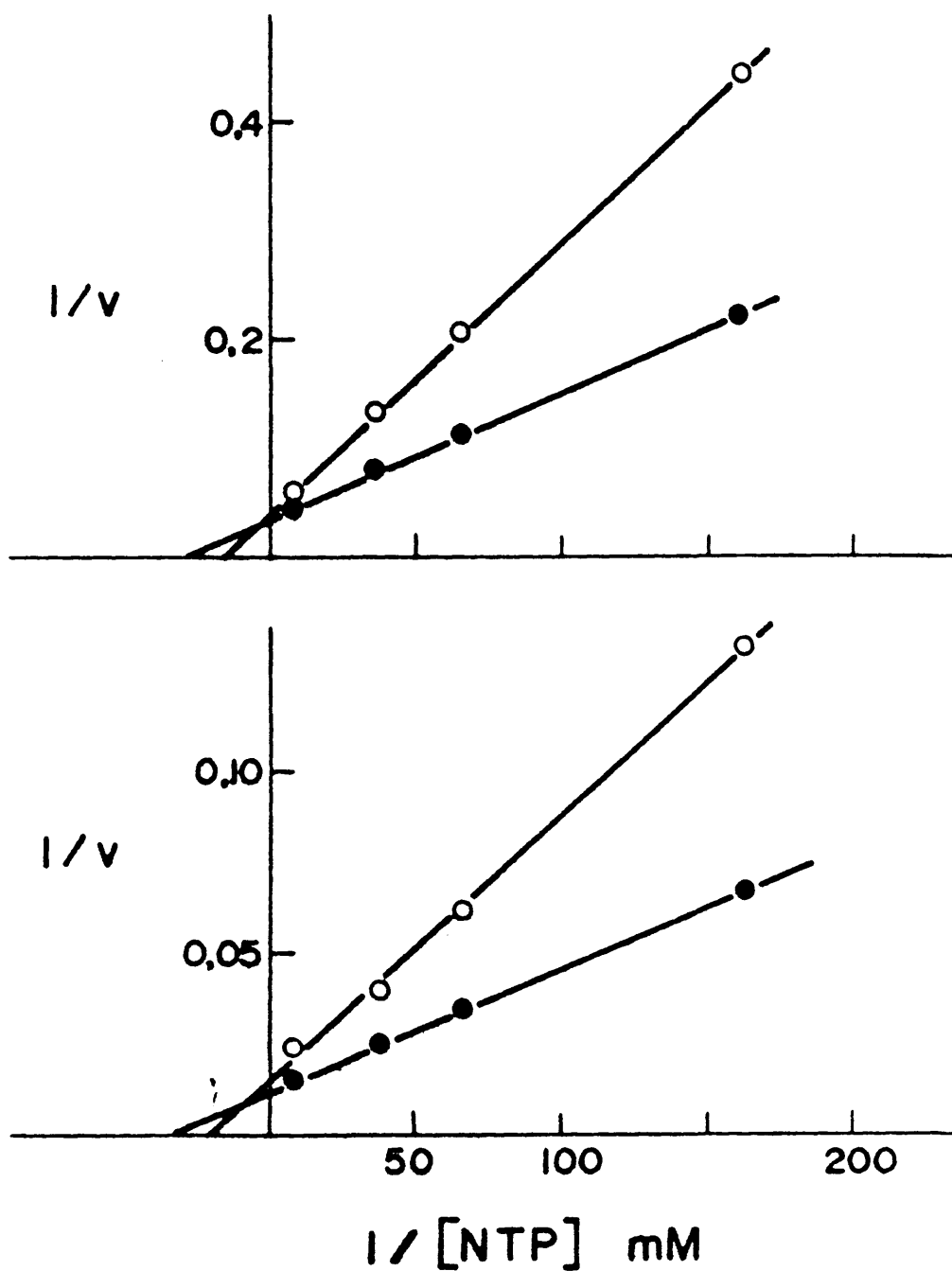


Figura 10. Inhibición de la incorporación de ATP por dATP y de la incorporación de dATP por ATP

En el panel superior se representa la gráfica de inversos para la incorporación de dATP por la poli(A) polimerasa, tanto en ausencia de otros nucleótidos (●) como en presencia de ATP 0,015 mM (○). En el panel inferior se expone la misma representación para la incorporación de ATP en ausencia de otros nucleótidos (●) o en presencia de dATP 0,15 mM (○).

competitivamente la incorporación del otro sustrato. Todos estos datos apoyan la hipótesis de que la polimerización de ATP y dATP se debe a una única actividad enzimática.

La utilización de dATP como sustrato por la poli(A) polimerasa plantea el problema de la longitud de la cadena de poli(dA) sintetizada. Para tratar de esclarecer este problema se ha investigado la naturaleza del producto de la reacción de la poli(A) polimerasa con dATP como sustrato.

Para ello se ha incubado la poli(A) polimerasa con ^3H -dATP como sustrato y poli(A) como iniciador. El producto de la reacción se incubó con deoxirribonucleasa I para degradar la posible cadena polideoxiadenílica formada durante la reacción a deoxiadenosina 5' monofosfato. Posteriormente se trató con KOH para hidrolizar el RNA iniciador, así como para romper el enlace entre el poli(A) iniciador y la deoxiadenosina monofosfato que suponemos unida al extremo 3' del iniciador.

Las moléculas de deoxiadenosina monofosfato polimerizadas por el enzima no unidas al iniciador se convertirán en deoxiadenosina 5' monofosfato, puesto que proceden de digestión con deoxirribonucleasa I. Si existen moléculas de deoxiadenosina unidas al iniciador, se convertirán en deoxiadenosina tras el tratamiento citado, puesto que proceden de la digestión con deoxirribonucleasa I en su extremo 3' y de la ruptura con KOH de su enlace en posición 5'. La presencia de deoxiadenosina tras el tratamiento denotaría la unión de la cadena polideoxiadenílica al iniciador.

La reacción se realizó en un volumen de 100 μl , utilizando ^3H -dATP 0,25 mM como sustrato, se incubó durante 30 y 60 minutos a 30° C. La mezcla de ensayo fué filtrada por una columna de Sephadex G-25 para separar el producto de la reacción del sustrato. Las fracciones conteniendo el producto de reacción fueron

precipitadas con 0,1 volúmenes de acetato sódico al 20% y 2,5 volúmenes de etanol. Dichas fracciones se resuspendieron en 50 μ l de Tris-ClH, 50 mM, Cl_2Mg 10 mM, pH 7,5 y 15 μ gr deoxirribonucleasa I. La reacción de hidrólisis se incubó a 30^o C durante 30 minutos. Posteriormente se añadió KOH hasta una concentración de 0,3 N, incubándose la mezcla a 60^o C durante 30 minutos. La mezcla de hidrólisis fué neutralizada y aplicada a una placa de PEI-celulosa, eluyéndose la cromatografía con agua y posteriormente con PO_4H_2K 0,5 M, pH 3,4. El cromatograma fué cortado en tiras transversales de 3 mm de grosor, cuya radioactividad se determinó. El resultado del experimento se muestra en la figura 11.

Toda la deoxiadenosina trifosfato incorporada por el enzima aparece en forma de deoxiadenosina. El pequeño pico de radioactividad presente en la posición del dAMP puede deberse a degradación del dATP. Este dato demuestra que el enzima une el producto de reacción al iniciador. Por otra parte, es de destacar que sólo se une una molécula de deoxiadenosina monofosfato por molécula de iniciador. La prolongación del tiempo de incubación con el enzima a 60 minutos aumenta la incorporación de radioactividad sin aumentar la longitud de la cadena.

Estos datos indican que la actividad enzimática responsable de la incorporación de dATP no es una actividad DNA polimerasa, la cual formaría cadenas de más de un nucleótido. Por otra parte, la incorporación de una única molécula de dAMP por cadena de RNA iniciador es compatible con la hipótesis de que esta incorporación es debida a la poli(A) polimerasa, dadas las características de especificidad de iniciador de este enzima. La poli(A) polimerasa reconoce a RNAs como iniciadores, pero no a moléculas de DNA. La incorporación de una molécula de deoxiadenosina monofosfato en el extremo 3' del RNA iniciador podría hacer a esta molécula equiparable al DNA para el enzima, dejando por tanto de ser iniciador para la poli(A) polimerasa. Por esta

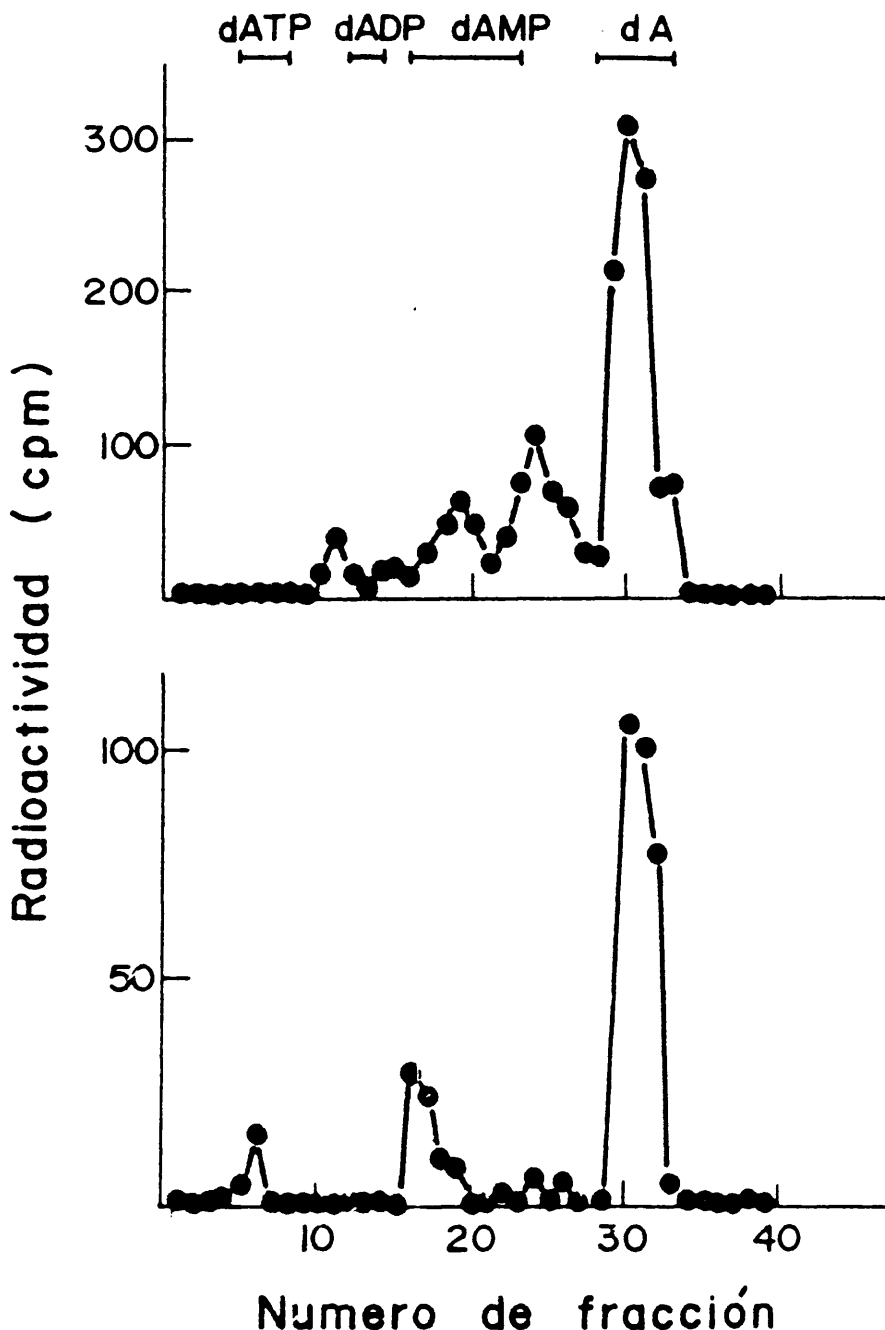


Figura 11. Análisis del producto de reacción de la poli(A) polimerasa utilizando dATP como sustrato

Preparaciones parcialmente purificadas de poli(A) polimerasa se incubaron en las condiciones de ensayo descritas sustituyendo el ATP por dATP. La incubación se llevó a cabo durante 30 min. (panel inferior) ó 60 min. (panel superior). El producto de reacción fué separado del sustrato por filtración en columna de Sephadex G-25. El producto de reacción se sometió a hidrólisis con DNase I y a hidrólisis alcalina, siendo posteriormente neutralizado el hidrolizado y sometido a cromatografía en capa fina en PEI-celulosa. La placa se cortó en tiras de 3 mm y se determinó la radioactividad presente en cada fracción.

razón sólo se formarían cadenas de un nucleótido usando dATP como sustrato.

La capacidad para utilizar dATP como sustrato se ha descrito también para la poli(A) polimerasa de hepatomas poco diferenciados de ratas, que presenta con dATP un 8% de la actividad que tiene con ATP (Rose y col., 1975) y de hígado de rata, que tiene un 18% de actividad con dATP (Niessing, 1975). Sin embargo, en ninguno de estos dos casos se ha estudiado la naturaleza del producto de la reacción.

3.d. Efecto de la concentración de nucleótidos sobre la actividad de la poli(A) polimerasa

3.d.1. Efecto de la concentración de ATP utilizando RNA como iniciador

Este estudio se ha realizado utilizando RNA de Tórula como iniciador en presencia de una concentración de Cl_2Mn 2mM por encima de la concentración de ATP.

La variación de la actividad del enzima con la concentración de ATP se muestra en la figura 12. Lo más destacado es que existe una inhibición de la actividad enzimática a concentraciones de ATP mayores de 0,5 mM.

A partir de los datos de actividad para concentraciones de ATP menores de 0,5 mM se puede deducir una K_M del enzima para el ATP de 0,04 mM.

Con los datos de actividad para concentraciones de ATP superiores a 0,5 mM se ha realizado un estudio de la inhibición por exceso de sustrato, estudio encaminado a conocer el tipo de inhibición y sus parámetros cinéticos.

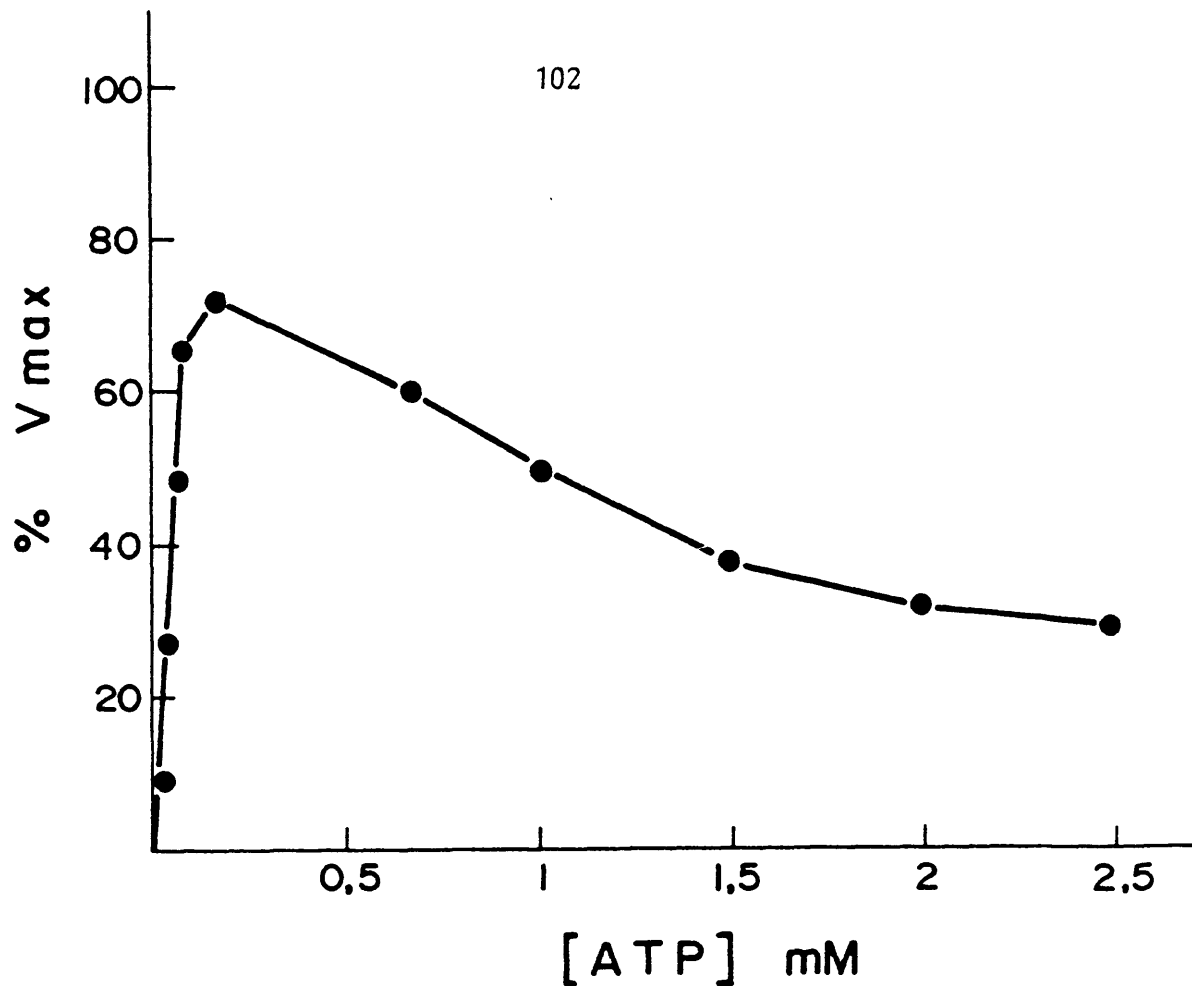


Figura 12. Efecto de la concentración de ATP sobre la actividad poli(A) polimerasa

Preparaciones parcialmente purificadas de poli(A) polimerasa se incubaron durante 30 minutos utilizando RNA de Tórula como iniciador y concentraciones variables de ATP. La concentración de Cl_2Mn fué de 2 mM por encima de la concentración de ATP en cada ensayo. La actividad se representa como porcentaje de la V_{max} . La V_{max} se estimó por extrapolación de los datos obtenidos a concentraciones de ATP inferiores a 0,25 mM en una representación de inversos.

Para estudiar la inhibición se han utilizado dos tipos de representaciones: la representación de Hill y la representación de Dixon. En la representación de Hill se expresa en ordenadas el logaritmo decimal del cociente resultante de dividir la diferencia entre la velocidad máxima y la velocidad en cada punto por la velocidad en dicho punto. En abcisas se representa el logaritmo decimal de la concentración de ATP. La representación obtenida se muestra en la figura 13. Los puntos obtenidos experimentalmente se sitúan en una recta cuya pendiente es 0,9, lo cual indica que no hay cooperatividad en la inhibición. El tipo de recta se corresponde con un modelo de inhibición "no competitiva" o "anticompetitiva". La correspondiente K_I , que es el antilogaritmo del punto de intersección de la recta con el eje de abcisas, es de 1 mM.

En la representación de Dixon se expresa en abcisas la concentración de inhibidor (en este caso ATP) y en ordenadas el inverso de la velocidad. La figura 14 muestra la gráfica obtenida. En esta representación los datos experimentales se ajustan también a una recta, correspondiéndose con los calculados teóricamente para una inhibición "no competitiva" o "anticompetitiva". El punto de intersección de la recta con el eje de abcisas es el valor de la K_I cambiado de signo en esta representación, pudiéndose calcular una K_I del enzima para el ATP de 1 mM.

Todos estos datos coinciden en señalar que existe una inhibición por exceso de sustrato, que es de tipo "no competitiva" o "anticompetitiva", con una K_I de 1 mM. A partir de los valores calculados para la K_I y para la K_M y calculando la velocidad máxima a partir de una representación de Lineweaver-Burke considerando los puntos en que la concentración de ATP es inferior a 0,5 mM, pueden calcularse los valores teóricos de actividad para las diferentes concentraciones de ATP suponiendo diversos modelos de inhibición. Los datos teóricos que mejor se

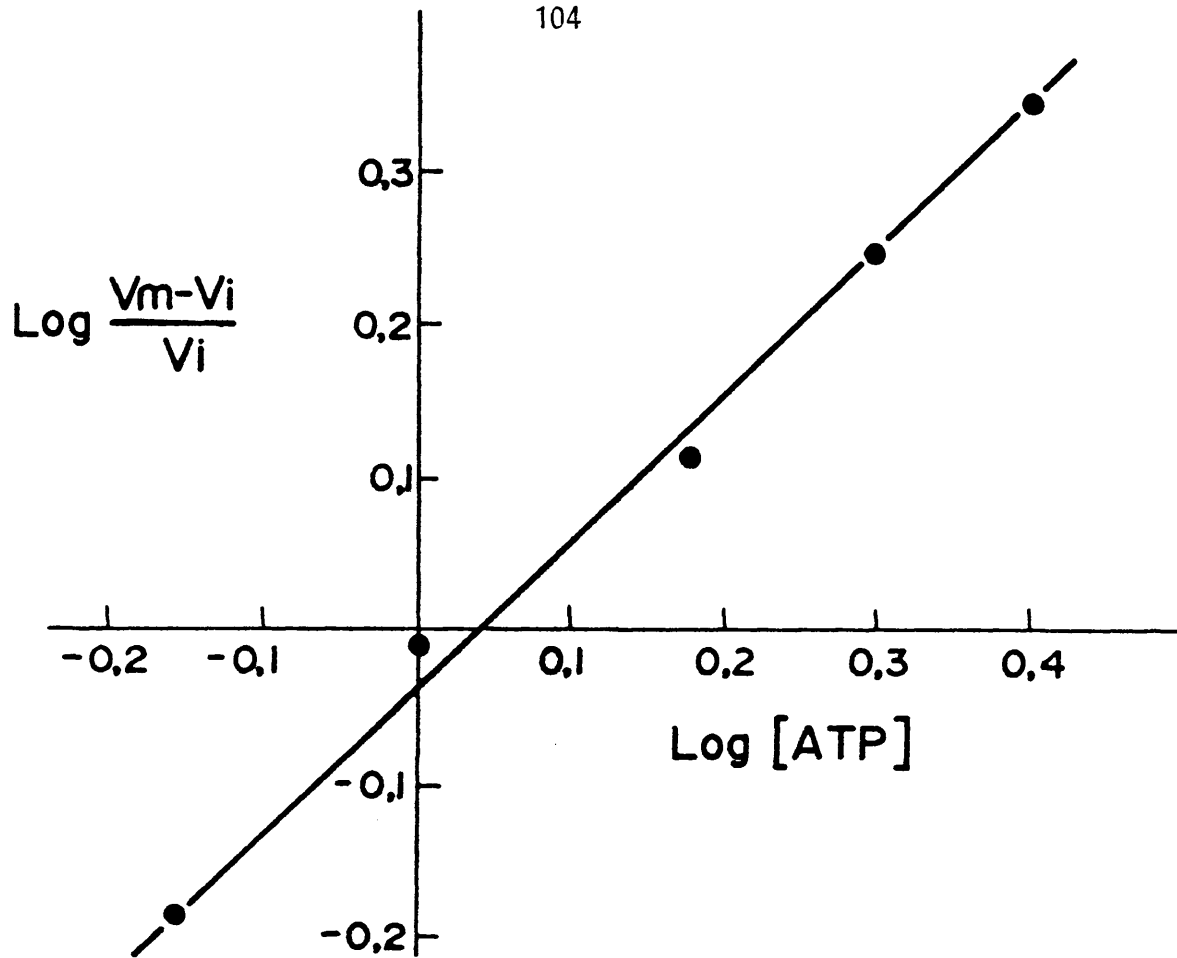


Figura 13. Representación de Hill de la inhibición por ATP de la actividad poli(A) polimerasa

Se ensayó la actividad poli(A) polimerasa de una preparación parcialmente purificada del enzima en presencia de diversas concentraciones de ATP. Las condiciones de ensayo fueron las reseñadas en la Figura 12. La V_{max} se obtuvo por extrapolación a partir de las actividades^{max} obtenidas a concentraciones de ATP inferiores a 0,25 mM en una representación de inversos.

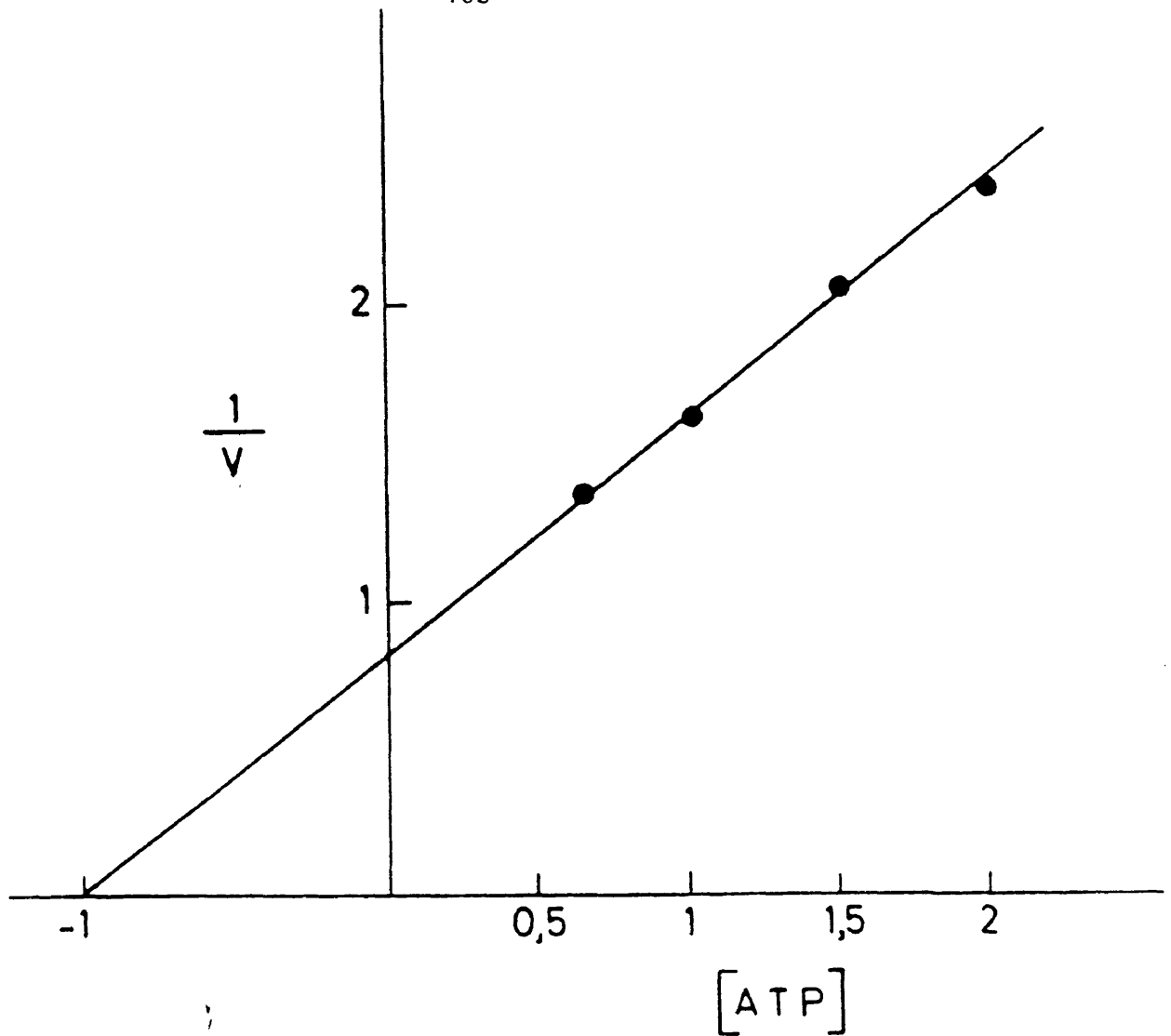


Figura 14. Representación de Dixon de la inhibición por ATP de la actividad poli(A) polimerasa

Se ensayó la actividad poli(A) polimerasa de preparaciones parcialmente purificadas de enzima a diversas concentraciones de ATP. Las condiciones de ensayo fueron las reseñadas en la Figura 12.

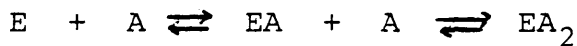
ajustan a los experimentales se obtienen cuando se supone un modelo de inhibición "anticompetitiva". La actividad teórica para cada concentración de ATP se calculó según la siguiente fórmula:

$$V = V_M \frac{[ATP]}{K_M + [ATP] \left(1 + \frac{ATP}{K_I}\right)}$$

En la figura 15 se representan los datos experimentales y los teóricos suponiendo una inhibición "anticompetitiva" con una $K_I = 1$ mM.

Cualquier inhibición por exceso de sustrato supone la unión al enzima de dos moléculas de sustrato, una que se une al sitio activo para ser sustrato de la reacción y otra segunda molécula que se une al enzima, inhibiendo su actividad. Hay varias posibilidades según el lugar al que se una la segunda molécula de sustrato. Según Laidler (1973), se pueden distinguir tres mecanismos:

a) Unión simultánea de las dos moléculas de sustrato al mismo sitio del enzima según el siguiente esquema:



EA_2 es un complejo inactivo o poco activo y por lo tanto la reacción se inhibe en su totalidad o en cierto grado al aumentar la concentración de sustrato y formarse EA_2 .

b) Si la reacción transcurre por un mecanismo de modificación del enzima, puede formarse un complejo inactivo al unirse la segunda molécula de sustrato de la siguiente manera:

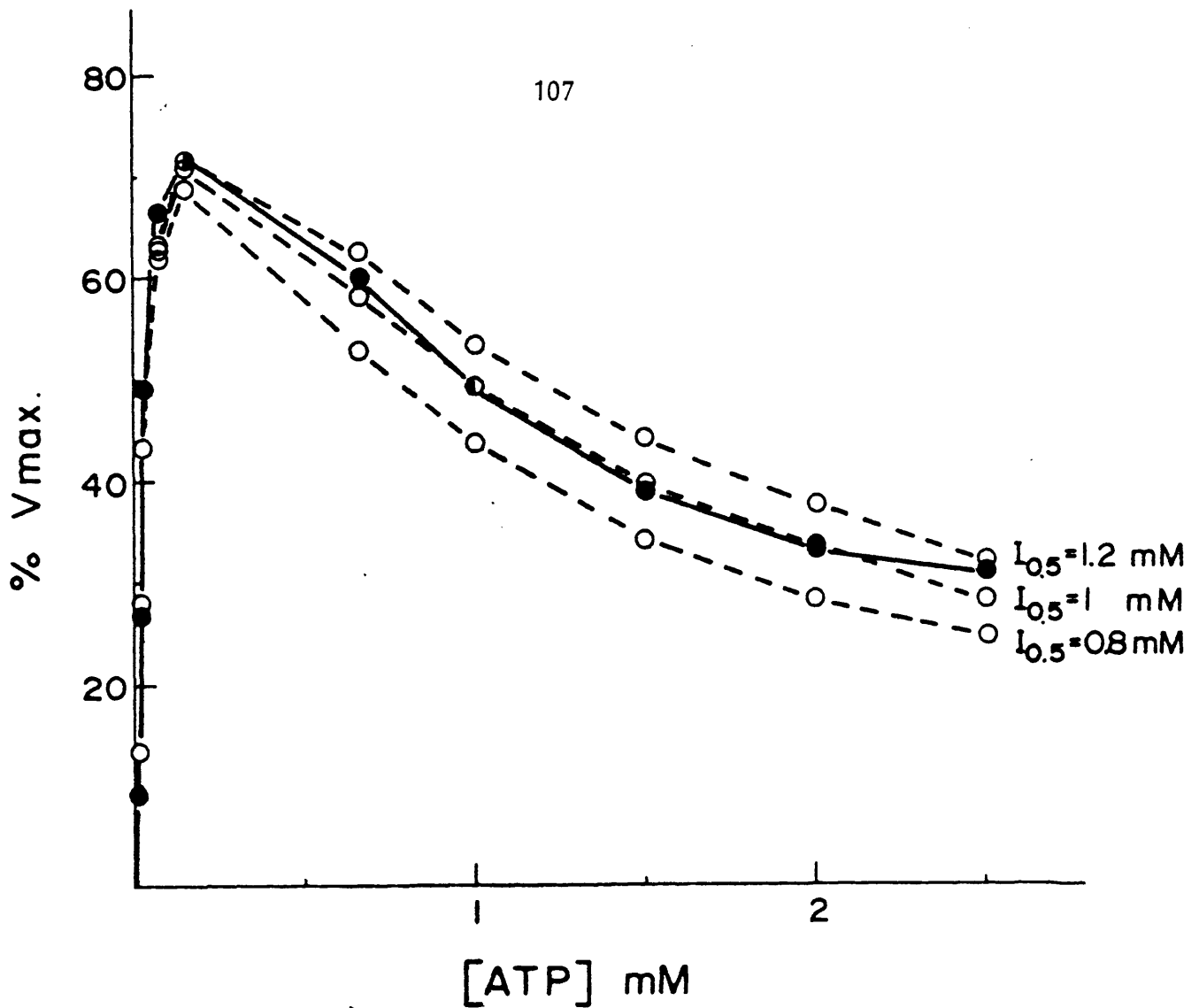
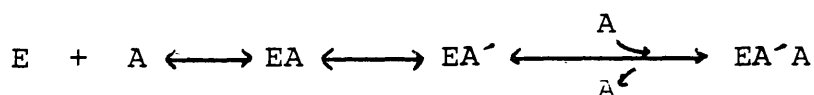


Figura 15. Caracterización del tipo de inhibición por ATP de la poli(A) polimerasa

Comparación de la curva experimental (●) de la variación de la actividad enzimática con la concentración de ATP y las curvas teóricas (○) obtenidas suponiendo una inhibición anticompetitiva por ATP. La K_M utilizada para los cálculos teóricos fué la obtenida a partir de los datos experimentales. La $I_{0.5}$ utilizada para los cálculos teóricos fué de 0,8, 1 y 1,2 mM.



El complejo EA'A sería inactivo, total o parcialmente.

c) La segunda molécula de sustrato se une al enzima en un sitio diferente del sitio activo, inactivando al enzima por un mecanismo que puede ser alostérico, es decir, por cambio en la conformación del enzima.

La primera disyuntiva es si la poli(A) polimerasa tiene dos sitios diferentes de unión para el ATP o solamente uno. Para contestar esta pregunta se realizó un estudio de la cinética utilizando dATP como sustrato.

3.d.2. Efecto de la concentración de dATP utilizando RNA como iniciador

El estudio de la variación de la actividad enzimática con la concentración de dATP se realizó con RNA de Tórula como iniciador y con concentraciones de Cl_2Mn 2 mM por encima de la correspondiente concentración de dATP en cada ensayo. La cinética obtenida se muestra en la figura 16. Cuando se utilizan dATP no existe inhibición por exceso de sustrato. Por otro lado, a partir de esta gráfica se puede calcular una K_M para el dATP de 0,06 mM.

La cinética para el dATP indica que el enzima tiene dos sitios de unión para el ATP, el sitio activo, que tiene afinidad tanto para el ATP como para el dATP y otro sitio, al que podemos llamar "sitio inhibidor" que tiene afinidad para el ATP pero no para el dATP, diferenciándose en esto del sitio activo. Estos resultados sugieren que la inhibición por exceso de ATP puede corresponder al tercer modelo enunciado por Laidler.

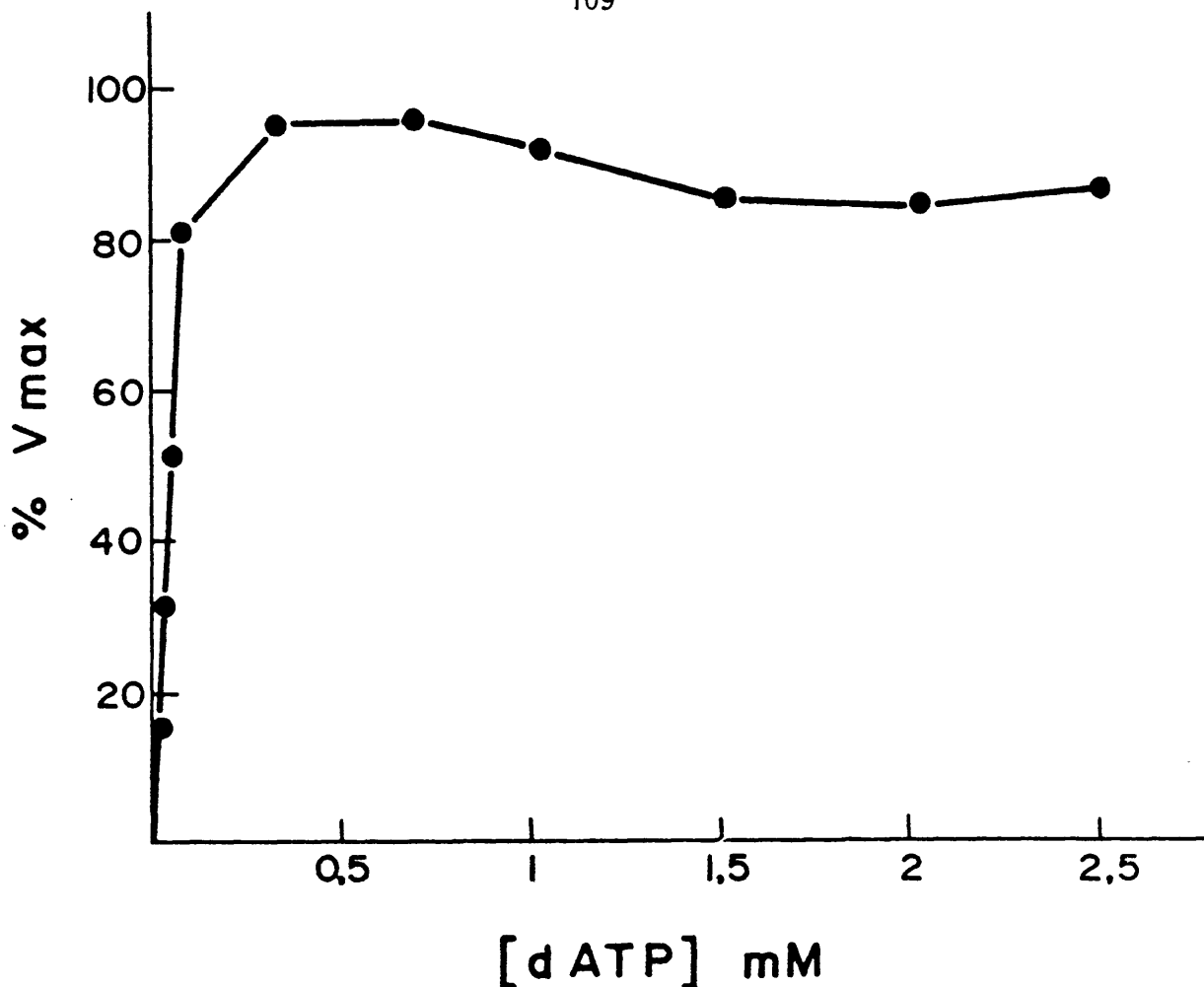


Figura 16. Efecto de la concentración de dATP sobre la actividad poli(A) polimerasa

Se ensayó la actividad enzimática responsable de la polimerización de dATP en presencia de diversas concentraciones de dATP. Los ensayos se realizaron utilizando RNA de Tórula como iniciador. La concentración de Cl_2Mn fué de 2 mM por enzima de la concentración de nucleótido en cada ensayo. El tiempo de incubación fué de 30 minutos. La V_{max} se calculó por extrapolación a partir de una representación de inversos de los datos obtenidos experimentalmente.

3.d.3. Efecto de las concentraciones de ATP utilizando poli(A) como iniciador

El experimento fué similar al descrito anteriormente usando RNA de Tórula como iniciador. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 17, en la que se observa que la inhibición por exceso de ATP es menos acusada cuando se usa poli(A) como iniciador que cuando se utiliza RNA de Tórula. Este dato se confirma cuando se realiza la representación de Hill (figura 18), a partir de la cual se puede calcular una K_I de 2 mM.

El hecho de que la K_I para el ATP varíe según el iniciador que se utilice permite postular que el "sitio inhibidor" del ATP es el sitio de interacción del enzima con el RNA iniciador. Esta hipótesis explica que la K_I del ATP con poli(A) es mayor que con RNA de Tórula, puesto que experimentos reseñados en la tesis de licenciatura demostraban que el enzima tiene más afinidad por el poli(A), cuya constante de Michaelis es de 0,01 mM, que por el RNA de Tórula.

Esta hipótesis también explica que el dATP no presente inhibición por exceso de sustrato, puesto que el sitio de unión del iniciador no tiene aparentemente afinidad por deoxinucleótidos, como sugiere el hecho de que el DNA no puede actuar como iniciador.

3.d.4. Efecto de la concentración de RNA a dos concentraciones de ATP

Para confirmar esta hipótesis se ha realizado un estudio para conocer el efecto de distintas concentraciones de RNA iniciador sobre la actividad poli(A) polimerasa con dos concentraciones de ATP, 0,12 mM y 1 mM. En la figura 19 se muestra la representación de Lineweaver-Burke para las dos series de en-

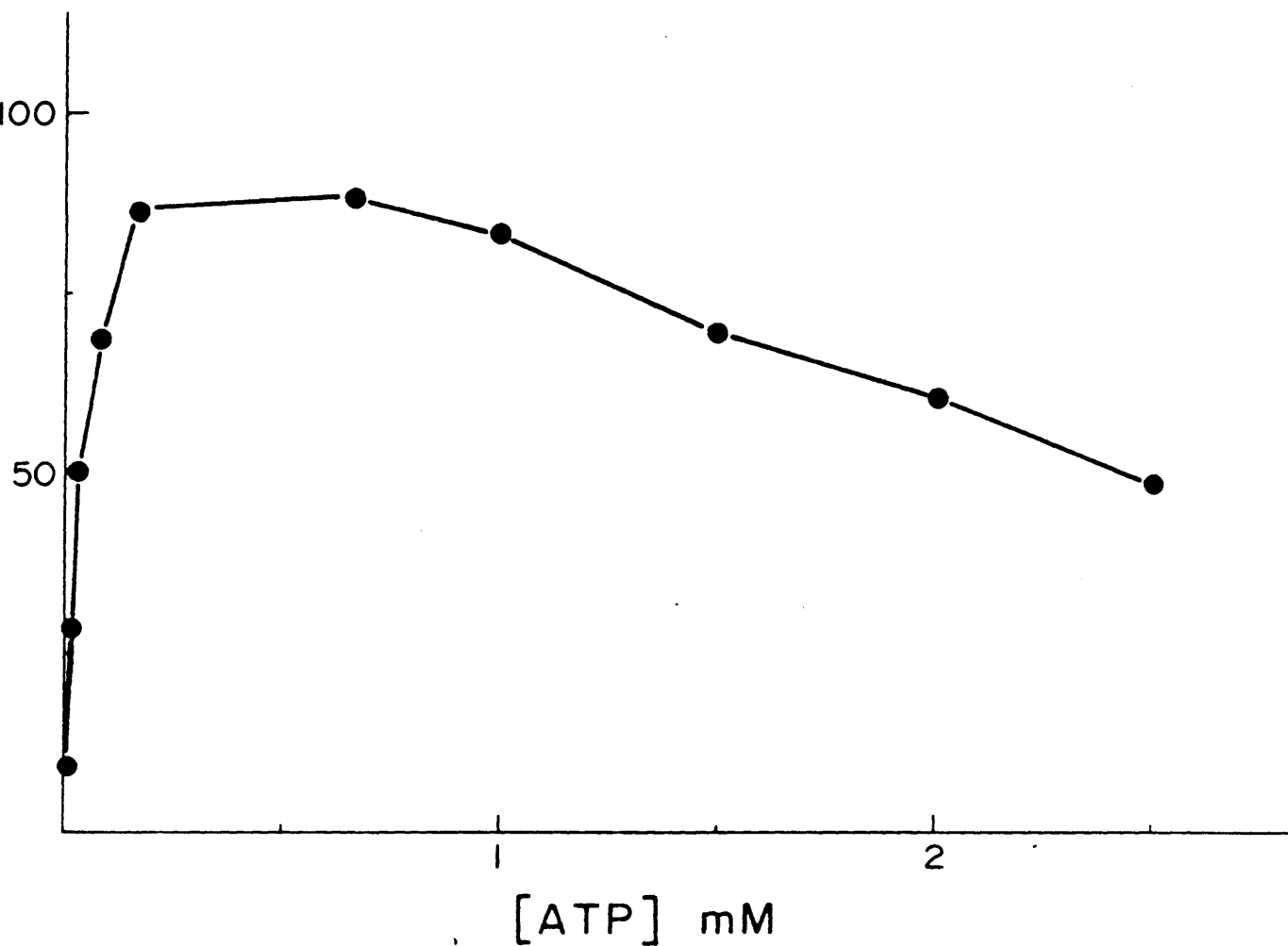


Figura 17. Efecto de la concentración de ATP sobre la actividad poli(A) polimerasa utilizando poli(A) como iniciador

Se ensayó la actividad poli(A) polimerasa de preparaciones parcialmente purificadas del enzima en presencia de diversas concentraciones de ATP. En este ensayo se utilizó ácido poliadenílico como iniciador. Las condiciones de ensayo fueron las expuestas en la Figura 12. El valor de la V_{max} se calculó por extrapolación a partir de una representación de inversos de los datos correspondientes a concentraciones de ATP inferiores a 0,25 mM.

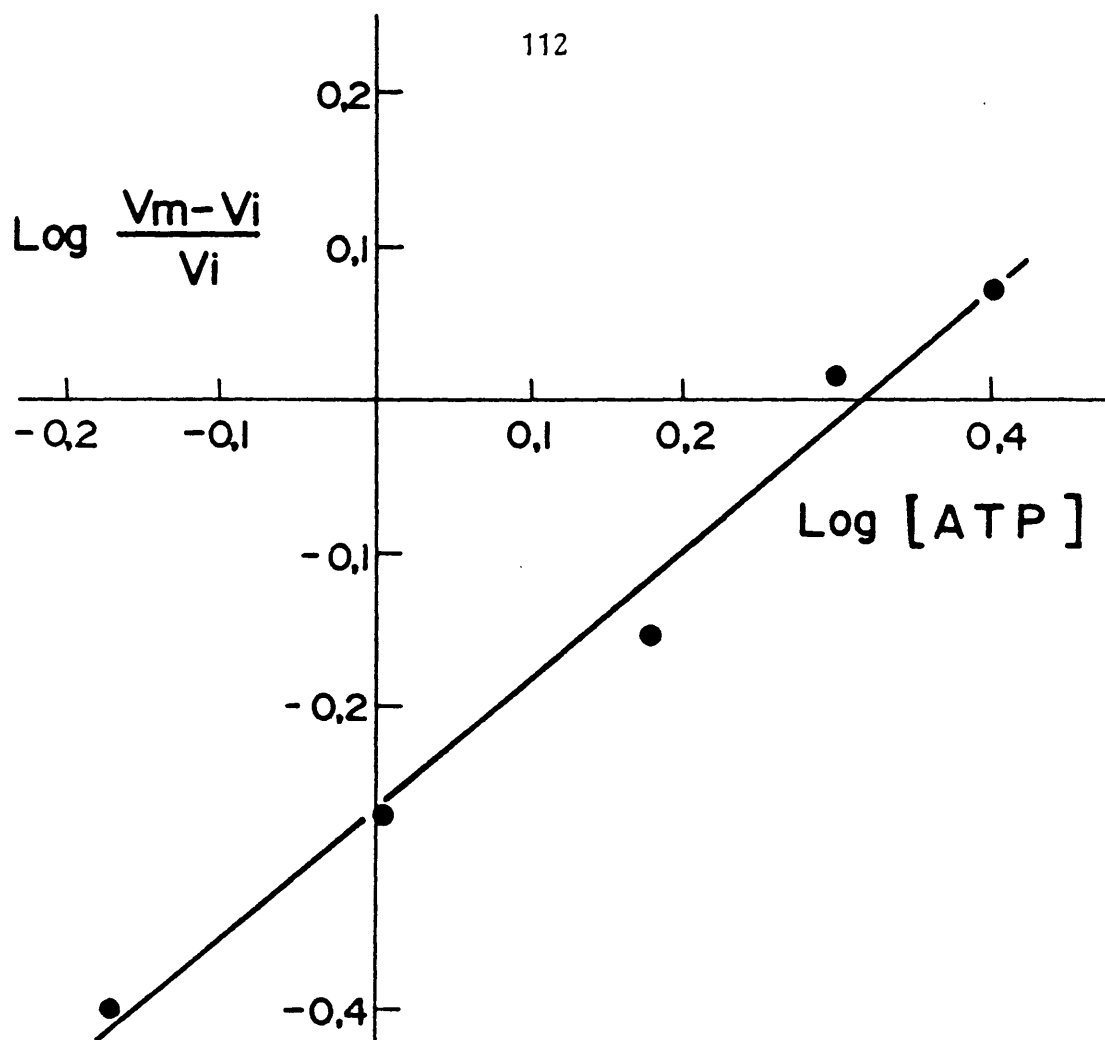


Figura 18. Representación de Hill de la inhibición por ATP utilizando poli(A) como iniciador

Se ensayó la actividad poli(A) polimerasa de preparaciones parcialmente purificadas en presencia de diversas concentraciones de ATP. La obtención de la V_{max} se realizó por extrapolación de las actividades enzimáticas obtenidas a concentraciones de ATP inferiores a 0,25 mM.

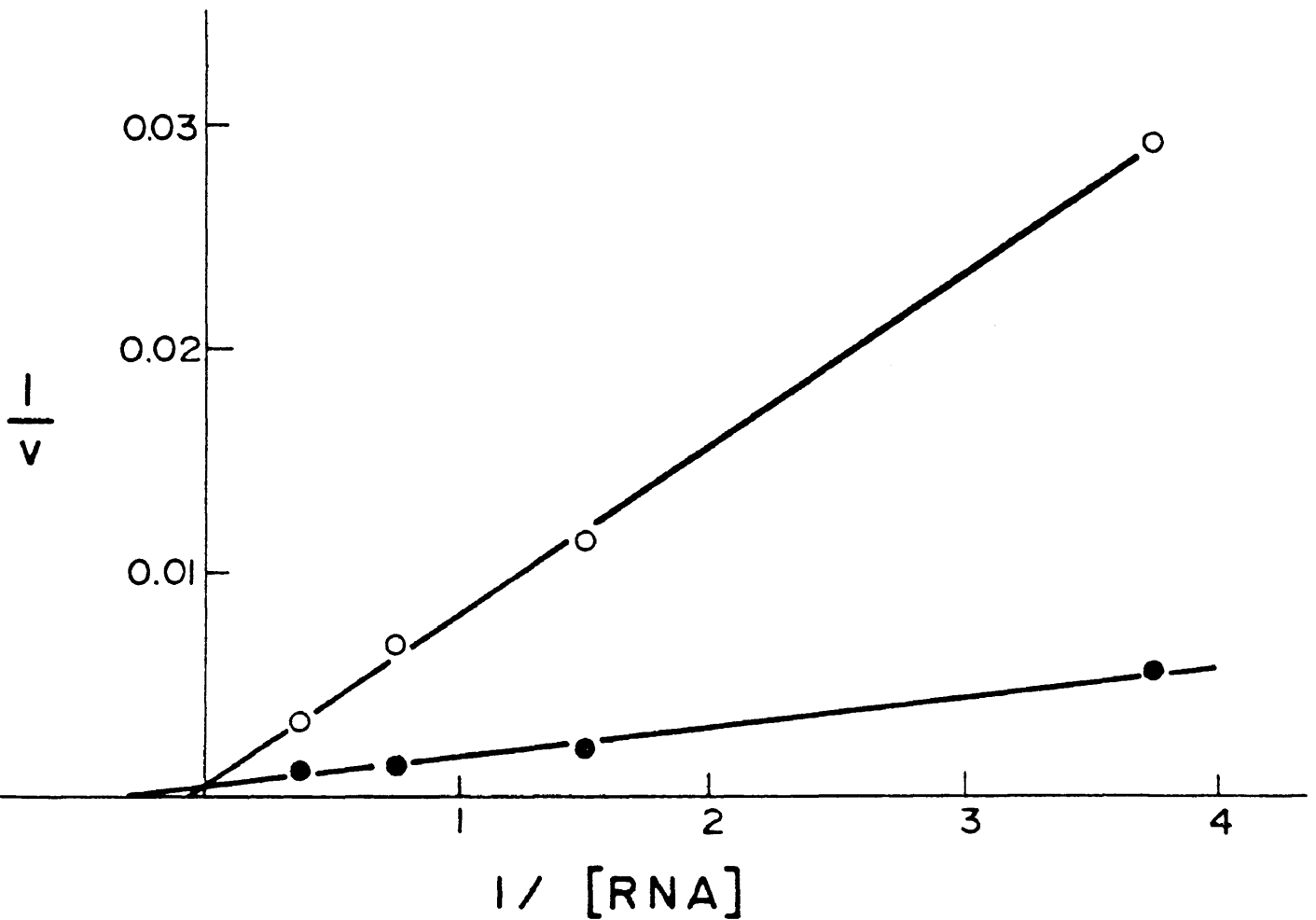


Figura 19. Efecto de la concentración de RNA iniciador sobre la inhibición por ATP

La actividad poli(A) polimerasa se ensayó en preparaciones parcialmente purificadas del enzima con las siguientes concentraciones de ATP y Cl_2Mn : 0,15 mM ATP - 2 mM Cl_2Mn (●) y 1 mM ATP - 3 mM Cl_2Mn (○).

sayos. Se observa que el aumento de la concentración de iniciador es capaz de revertir la inhibición originada por el ATP. En consecuencia el iniciador es capaz de desplazar al ATP del "sitio inhibidor".

Todos estos resultados permiten concluir que el "sitio inhibidor" para el ATP y el sitio de unión del RNA iniciador son el mismo o están muy relacionados, existiendo una competición entre el ATP y el RNA por el sitio del RNA iniciador. En consecuencia no es necesario postular un sitio diferente para el ATP distinto de los sitios para los dos sustratos de la reacción.

3.e. Algunos estudios sobre el mecanismo de reacción de la poli(A) polimerasa

La poli(A) polimerasa es un enzima que cataliza una reacción compleja en la que están implicados dos sustratos, el nucleósido trifosfato y el RNA iniciador. Estudiar el mecanismo de este tipo de reacciones es difícil, partiendo de un enzima que no está purificado a homogeneidad. Lo que vamos a exponer en este apartado son algunos datos indicativos, pero no concluyentes, del posible mecanismo de la reacción.

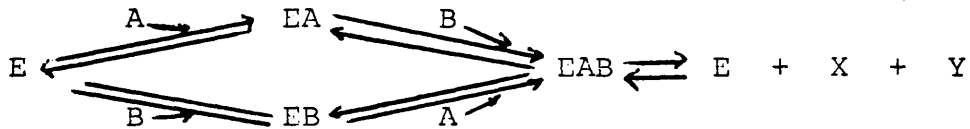
3.e.1. Efecto de las variaciones conjuntas de ATP y RNA iniciador sobre la actividad enzimática

Según Laidler y Bunting (1973), las reacciones con dos sustratos pueden transcurrir por cuatro mecanismos de reacción diferentes:

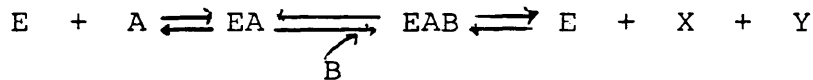
1ª) Mecanismos que suponen la formación de un complejo ternario compuesto por la unión simultánea al enzima de los dos

sustratos como paso previo a la catálisis enzimática. Según como se realice la unión de los dos sustratos el mecanismo puede ser:

a) No ordenado (al azar), cuando los dos sustratos se unen en cualquier orden temporal. El esquema sería:



b) Ordenado, cuando el orden de unión de los sustratos al enzima está estrictamente establecido de forma que primero debe unirse el sustrato A y sólo cuando se ha unido A puede unirse el sustrato B:

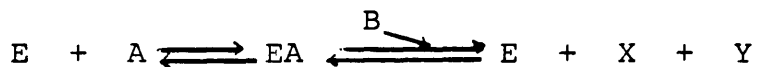


2ª) Mecanismo de ping-pong; en este mecanismo se une primero uno de los sustratos al enzima y sufre una modificación, quedando parte de la molécula de sustrato, modificada, unida al enzima. Otra parte de la molécula sale al medio como producto de la reacción. El segundo sustrato entra en contacto con el enzima cuando éste ya tiene unida la forma modificada del primer sustrato, forma que transfiere al segundo sustrato para dar origen al segundo producto de reacción. El esquema es:



3ª Este tercer mecanismo transcurre sin la formación de complejo ternario, mediante la unión de una molécula de sustrato al enzima, quedando dispuesta de tal forma que es capaz de reaccionar con una molécula del segundo sustrato, para dar lugar a los productos de reacción, sin que el segundo sustrato se

una al enzima:



La elucidación del tipo de mecanismo de una reacción enzimática determinada se puede realizar mediante estudios cinéticos de tres tipos: estudiando el efecto de la unión de uno de los sustratos a la unión del otro al enzima, estudiando la reacción en reverso y por estudios de inhibición por productos. Generalmente son necesarios los tres tipo de estudios para poder determinar claramente el mecanismo de reacción.

En esta tesis hemos podido realizar solamente el primer tipo de estudios, es decir, hemos estudiado el efecto de la concentración de uno de los sustratos a la unión al enzima del otro sustrato. Se ha estudiado la variación de la actividad enzimática con la concentración de ATP con tres cantidades diferentes de RNA de Tórula en la mezcla de ensayo. Estos estudios de actividad se han realizado utilizando concentraciones de ATP inferiores a 0,5 mM para evitar la inhibición por exceso de sustrato, inhibición que apenas existe para estas concentraciones de ATP dada la diferencia entre la K_M y la K_I . En la figura 20 se muestra la representación de Lineweaver-Burke para el ATP con tres concentraciones diferentes de iniciador en la mezcla de ensayo. La concentración de RNA iniciador no afecta a la K_M para el ATP, es decir, la concentración de RNA no varía la afinidad del enzima para el ATP. A partir de estos datos también se puede hacer la representación de Lineweaver-Burke para el iniciador a varias concentraciones de ATP, observándose que la concentración de ATP tampoco afecta a la K_M del enzima para el iniciador.

El que las constantes de afinidad de cada sustrato sean independientes de la concentración del otro sustrato indica que la reacción transcurre mediante la formación de un complejo ter-

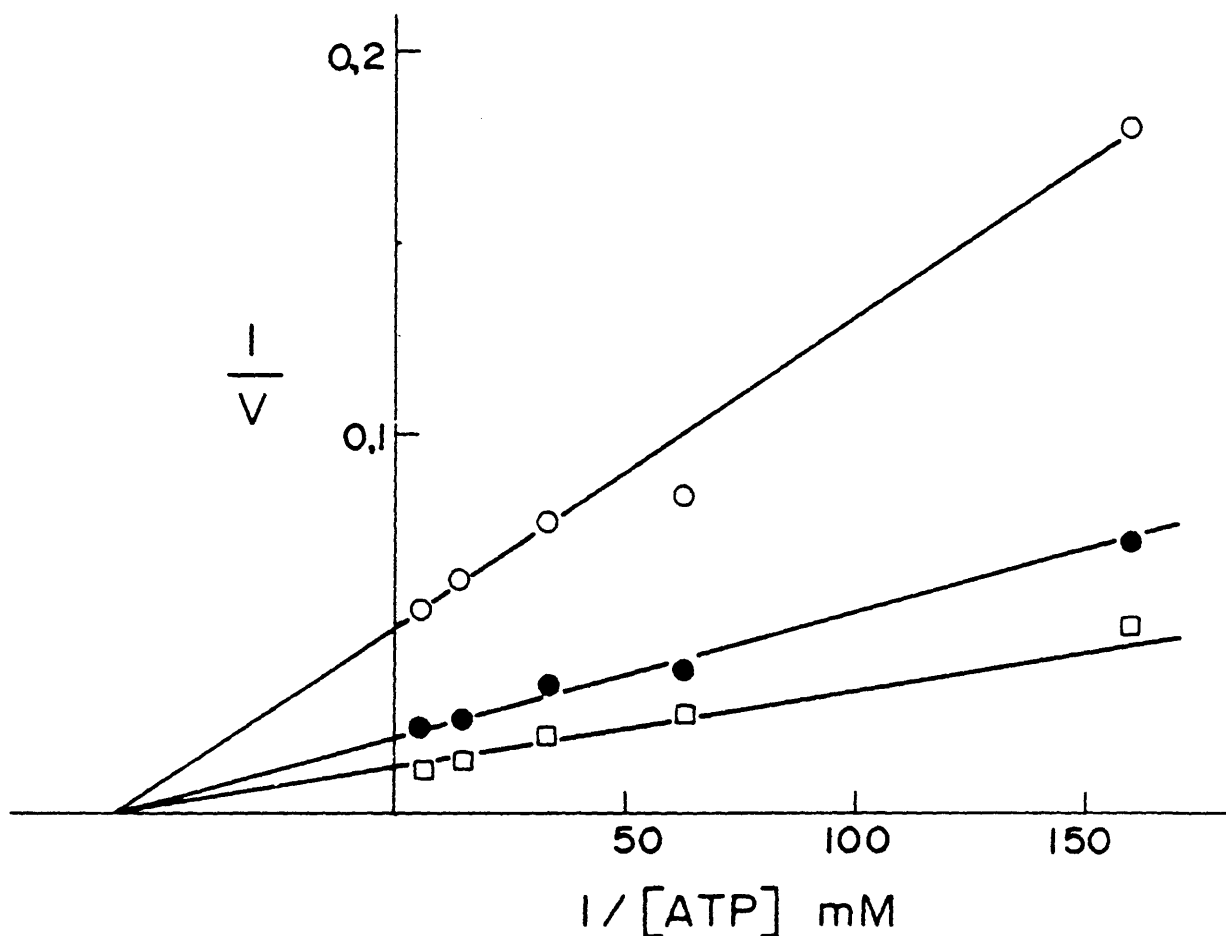


Figura 20. Efecto de la concentración de ATP y RNA sobre la actividad poli(A) polimerasa

Se ensayó la actividad poli(A) polimerasa de preparaciones parcialmente purificadas del enzima en presencia de diversas concentraciones de ATP. La concentración de Cl_2Mn fué en cada ensayo 2 mM por encima de la concentración de ATP. Se realizaron tres series de ensayos en los cuales la concentración de RNA de Tórula fué respectivamente de 0,33 mg/ml (○), 1 mg/ml (●) y 2 mg/ml (□).

nario, puesto que si se formara un complejo binario entre el enzima y un sustrato como paso previo necesario para la unión del otro sustrato, la constante de afinidad para el segundo sustrato sería dependiente de la concentración del primero.

Por otro lado, este dato apunta hacia un mecanismo no ordenado de formación del complejo ternario, pues en el modelo de formación ordenada la concentración del sustrato que se une en primer lugar puede afectar a la constante de afinidad para el sustrato que se une posteriormente.

Por lo tanto, los datos obtenidos sugieren, pero no demuestran, un mecanismo de reacción mediado por la formación no ordenada de un complejo ternario entre el enzima, el nucleósido trifosfato y el RNA iniciador como paso previo a la reacción de polimerización.

Todos estos estudios cinéticos parten de una limitación, están hechos a tiempo fijo (30 minutos) sin que conozcamos cómo afecta la concentración de nucleótidos a la cinética con respecto al tiempo, siendo este un factor que puede afectar la interpretación de los resultados obtenidos. No parece, en cambio, que la cantidad de enzima afecta a los resultados, puesto que experimentos similares realizados con diferentes cantidades de enzima han dado resultados equivalentes.

3.e.2. Variación de la longitud de la cadena de ácido poliadenílico con el tiempo de reacción

Otro aspecto que estudiamos del mecanismo de reacción fué el proceso de elongación de la cadena poliadenílica. Existen en teoría dos posibilidades, cada molécula de enzima se une a una molécula de RNA iniciador y le añade moléculas de AMP pro-

gresivamente. Alternativamente, cada molécula de enzima se une a una molécula de iniciador y le añade una molécula de AMP, des-haciéndose el complejo tras esta adición. En el primer caso, una molécula dada de enzima sintetizaría toda la cadena de poli(A) en un RNA y en el segundo, una cadena de poli(A) sería sintetizada por diferentes moléculas de enzima. Para llevar a cabo este estudio se realizaron diversas incubaciones en las condiciones de ensayo descritas en Material y Métodos, salvo que el volumen de ensayo se aumentó a 0,2 ml, manteniéndose las concentraciones de los componentes en sus valores habituales. A diversos tiempos de reacción se pararon los diferentes tubos de ensayo por adición de 0,8 ml de ClNa 0,3 M y 2 ml de etanol. Por otro lado, se recogió una alícuota de la mezcla de ensayo que fué precipitada con TCA y filtada para conocer la radioactividad total incorporada. Los tubos precipitados con etanol se mantuvieron 3 horas a -20°C y se centrifugaron para recoger el material precipitado. El precipitado de cada tubo se resuspendió en 50 μl de KOH 0,3 N y se mantuvo a 37°C durante 18 horas para que tuviera lugar la hidrólisis alcalina del RNA.

La mezcla resultante de la hidrólisis alcalina se neutralizó con ClH y se aplicó a una placa de PEI-celulosa para separar la adenosina del AMP y cuantificarlas, tal como se ha descrito en Material y Métodos, calculando a partir de estos datos la longitud de la cadena poliadenílica sintetizada por el enzima en cada incubación.

En el panel superior de la figura 21 se muestra la variación de la longitud de la cadena poliadenílica sintetizada por el enzima en función del tiempo de incubación usando RNA de Tó-rula como iniciador. En el panel inferior se muestra la variación del número de cadenas poliadenílicas sintetizadas con el tiempo. Este último estudio se hizo de la manera siguiente: en cada ensayo se tomó una alícuota en el momento de parar la reacción para conocer la radioactividad incorporada en ácido

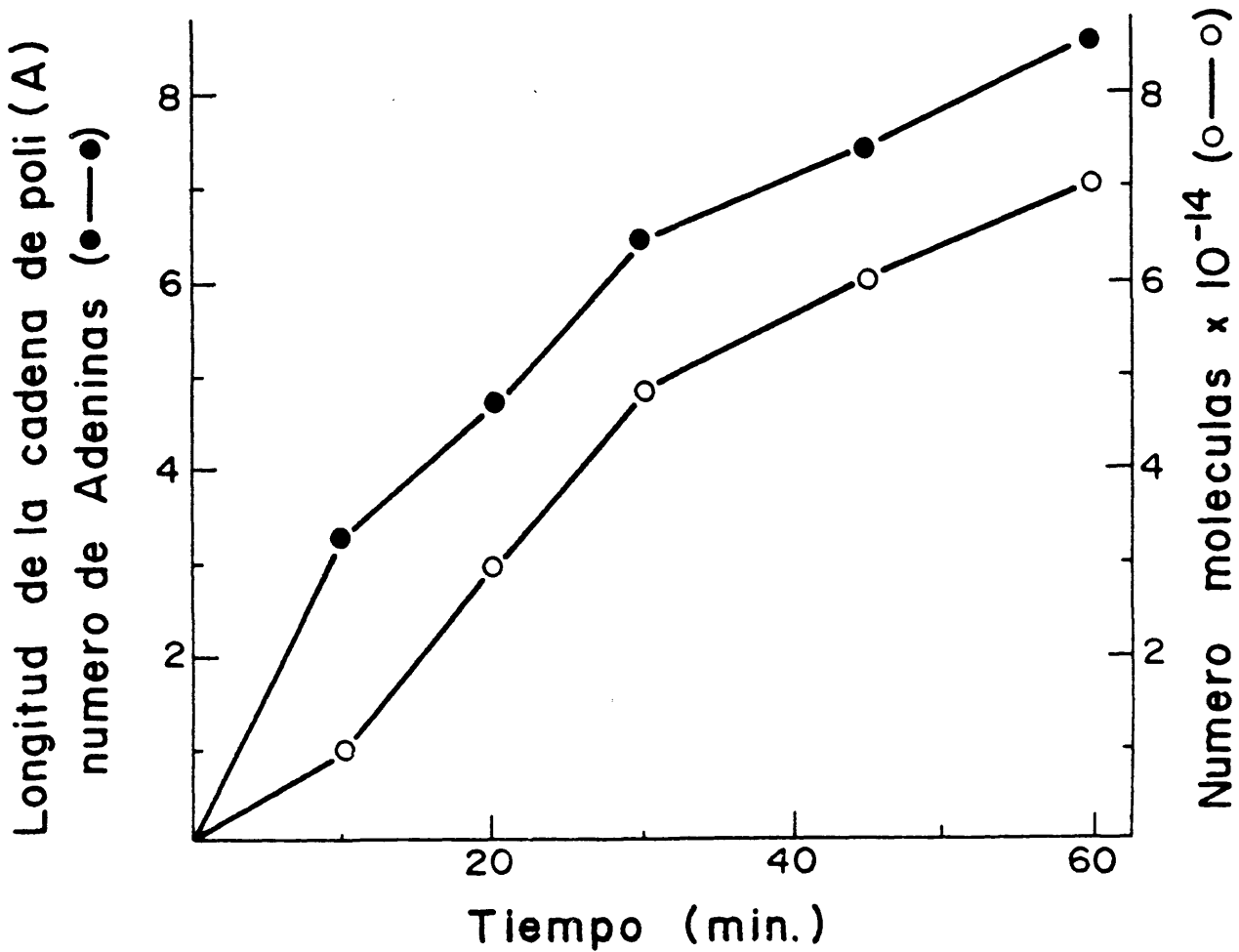


Figura 21. Efecto del tiempo de incubación sobre la longitud de la cadena de poli(A) sintetizada por la poli(A) polimerasa utilizando RNA de Tórula como iniciador

Se ensayó la actividad poli(A) polimerasa en las condiciones descritas en Material y Métodos durante diversos tiempos. En cada ensayo se calculó la longitud de la cadena poliadenílica sintetizada por el procedimiento descrito previamente. El número de cadenas poliadenílicas se calculó a partir de los datos de incorporación total y de la longitud media de las cadenas poliadenílicas en cada ensayo.

poliadenílico en cada ensayo; a partir de este dato y conociendo la actividad específica del ATP utilizado en la reacción se dedujo el número de moléculas de AMP incorporadas en ácido poliadenílico en cada ensayo; para cada ensayo calculamos el número medio de moléculas de AMP por cadena. El número total de moléculas de AMP polimerizadas dividido por el número medio de moléculas de AMP por cadena nos da el número de cadenas de ácido poliadenílico sintetizadas en cada ensayo.

En la figura 22 se representan los resultados del mismo tipo de estudios utilizando poli(A) como iniciador.

La primera conclusión de estos experimentos es que la longitud de la cadena poliadenílica va aumentando con el tiempo de incubación, pero no de forma lineal ni indefinida, sino que la longitud tiende a hacerse constante según aumenta el tiempo de incubación. Este efecto está más acusado cuando se usa poli(A) como iniciador, en que a partir de los 30 minutos de incubación la longitud media de las cadenas permanece prácticamente constante.

El número de cadenas formadas aumenta con el tiempo de forma lineal cuando se utiliza RNA de Tórula como iniciador. Cuando se utiliza poli(A) como iniciador, el aumento del número de cadenas formadas manifiesta el mismo período de latencia que se observó midiendo la cantidad de nucleótido incorporado.

Los datos experimentales no se ajustan enteramente a ninguna de las dos hipótesis de partida. Si la unión entre cada molécula de enzima y de iniciador fuera estable, el aumento de la longitud de la cadena sería lineal con el tiempo y el número de cadenas, en cambio, no variaría sustancialmente. En el caso de la otra hipótesis, que una molécula de enzima catalice la unión de una única molécula de AMP al iniciador, deshaciéndose el complejo a continuación, la longitud de cada cadena tendría que

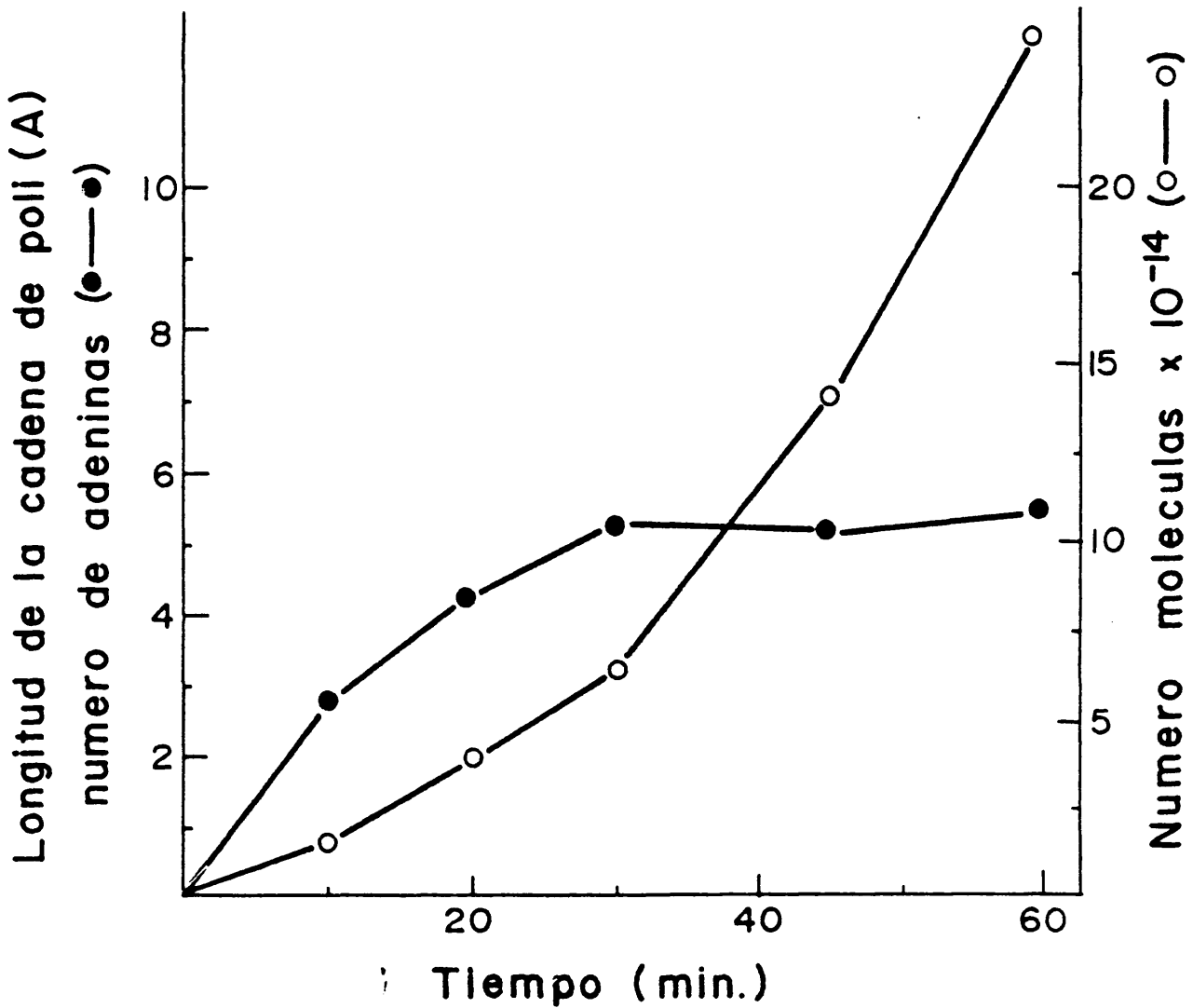


Figura 22. Efecto del tiempo de incubación sobre la longitud de la cadena de poli(A) sintetizada por la poli(A) polimerasa utilizando poli(A) como iniciador

Se ensayó la actividad poli(A) polimerasa en las condiciones descritas en Material y Métodos utilizando ácido poliadenílico como iniciador. El ensayo se paró a diversos tiempos y se estimó la longitud media de las cadenas poliadenílicas sintetizadas por el método descrito previamente. El número de cadenas poliadenílicas sintetizadas se calculó a partir de los datos de incorporación total y de la longitud media de la cadena poliadenílica sintetizada en cada ensayo.

aumentar linealmente con el tiempo. El número de cadenas aumentaría muy rápidamente al comienzo de la reacción, puesto que la probabilidad de que cada molécula de enzima se uniera a una molécula de iniciador sin poliadenilar es muy grande al comienzo de la reacción y va disminuyendo a medida que el número de moléculas de iniciador poliadeniladas va aumentando, por lo que el número de cadenas formadas tenderá a estabilizarse con el transcurso de la reacción.

Lo más probable, a la vista de los resultados experimentales, es que el mecanismo real sea intermedio entre los dos teóricos. Pudiera ser que cada molécula de enzima se una a una molécula de iniciador y le añada de forma secuencial varias moléculas de AMP, pero que este complejo sea inestable de forma que en cada ocasión sólo se añadan unas pocas moléculas de AMP al iniciador. Esta hipótesis explicaría, por ejemplo, los datos obtenidos usando poli(A) como iniciador; si suponemos que en cada unión enzima-iniciador el primero añade un número medio de 4 moléculas de AMP al iniciador, cada cadena tendería a tener una longitud media de 4 adenosinas, el número de cadenas iría aumentando con el tiempo y en cambio la longitud de la cadena tiende a estabilizarse porque la probabilidad de que una molécula ya adenilada vuelva a adenilarse es baja, dado que hemos calculado que el porcentaje de moléculas de iniciador poliadeniladas por el enzima a los 30 minutos de incubación es del 10% cuando se usa poli(A) como iniciador (suponiendo una longitud media de 100 adenosinas por molécula de ácido poliadenílico) y del 5% para el RNA de Tórula (suponiendo una longitud media de 100 nucleótidos por cadena).

Es posible que la inestabilidad del complejo enzima-iniciador se deba a la inadecuación de las condiciones de ensayo experimentales, pero que en condiciones fisiológicas la estabilidad sea mayor. Esto explicaría el que "in vitro" se formen cadenas poliadenílicas mucho más cortas de las que existen en el organismo (unas 10 adenosinas frente a 150-200).

B.- ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD POLI(A) POLIMERASA DURANTE EL DESARROLLO DE Artemia

1. Variación cuantitativa de la actividad poli(A) polimerasa durante el desarrollo

Una vez expuestos los estudios que se han realizado sobre la caracterización de la actividad poli(A) polimerasa presente en embriones enquistados de Artemia, se describen en esta sección los resultados obtenidos en el estudio de esta actividad durante el desarrollo posterior del embrión.

En primer lugar se realizó un estudio para conocer la variación de la actividad durante el desarrollo. Se cultivaron poblaciones sincronizadas de embriones, que se recogieron a distintos tiempos, considerando como tiempo cero el momento en el que los quistes se incubaron a 30°C en el medio salino. En estas condiciones y con los lotes de quistes utilizados, la eclosión tiene lugar hacia las 18 horas de incubación.

Cuando la incubación había de ser superior a las 40 horas, las nauplias fueron alimentadas con homogenados de algas desde el momento de la eclosión para evitar cualquier influencia del ayuno sobre los parámetros bioquímicos (Osuna y Sebastián, 1980).

Las poblaciones de embriones y larvas se homogeneizaron y se determinó la actividad poli(A) polimerasa en las diferentes fracciones subcelulares.

La figura 23 muestra los niveles de actividad poli(A) polimerasa en diferentes estadios del desarrollo temprano. Se observa un aumento de actividad enzimática en el momento de la eclosión de las nauplias. Este aumento va seguido de un descenso en etapas posteriores, en las cuales los niveles de actividad enzimática por 10^5 animales son inferiores a los encontrados en

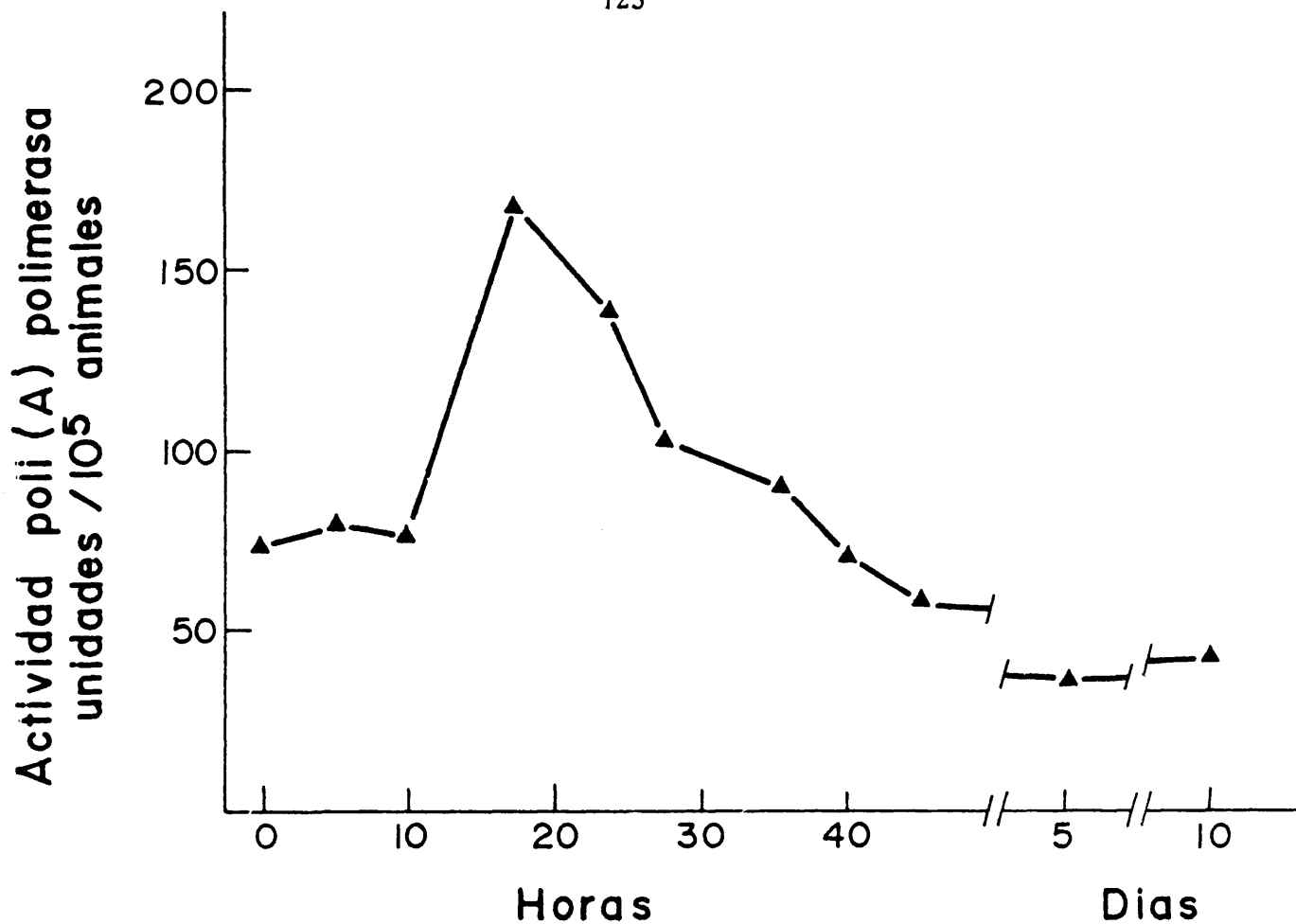


Figura 23. Niveles de actividad poli(A) polimerasa durante el desarrollo de Artemia

Embriones enquistados y nauplias de Artemia de diversas edades se homogenizaron y se obtuvieron las distintas fracciones subcelulares. En cada fracción subcelular se determinó la actividad poli(A) polimerasa. En la gráfica se representa la actividad total, obtenida como suma de las actividades presentes en las fracciones subcelulares.

en los embriones en criptobiosis.

Una posible causa del descenso de actividad poli(A) polimerasa podría deberse a la interferencia con el ensayo del enzima producida por la inducción de una actividad ribonucleásica que tiene lugar a partir de la eclosión (Sebastián y Heredia, 1978). Sin embargo, hemos calculado que esta actividad daría cuenta de la degradación de menos de 10% del RNA iniciador presente en el ensayo, teniendo en cuenta los volúmenes de extracto ensayados para medir la actividad poli(A) polimerasa y la concentración de RNA iniciador que se utiliza en el ensayo. Estos datos nos permiten afirmar que la inducción de dicha actividad ribonucleásica no influye en las determinaciones de las actividades de la poli(A) polimerasa.

El descenso de los niveles de poli(A) polimerasa que se produce durante el período larvario temprano puede interpretarse teniendo en cuenta que los embriones criptobióticos presentan una actividad enzimática muy elevada en comparación con otros sistemas animales (Winters y Edmonds, 1973 a; Niessing, 1975). Los niveles de actividad encontrados en los animales adultos, aunque inferiores a los de los quistes, son comparables a los de los sistemas animales antes mencionados.

La utilización de drogas que afectan a diferentes procesos bioquímicos permite obtener una información preliminar sobre la importancia de estos procesos en la variación del parámetro objeto de estudio. En este sentido, se ha demostrado la posibilidad de utilizar Actinomicina D, alfa-amanitina y cicloheximida in vivo en cultivos de nauplias de Artemia (Cano y col., 1979; Quintanilla y Renart, 1980). Se han utilizado estas tres drogas que afectan a los procesos de transcripción y traducción para conocer su efecto sobre el descenso de los niveles de la poli(A) polimerasa en las primeras horas del desarrollo larvario.

Se recogieron nauplias a las 4 horas de la eclosión (T22) y se incubaron en ausencia y presencia de 5 μ g/ml de alfa-amanitina, 100 μ g/ml de actinomicina D y 50 μ g/ml de cicloheximida. Tras 6 horas de incubación, las nauplias se recogieron y homogeneizaron en tampón BH. El homogenado se centrifugó a 15.000xg durante 20 minutos y se valoró la actividad poli(A) polimerasa en los correspondientes sobrenadantes. Ninguna de las drogas en las condiciones usadas en el ensayo de la poli(A) polimerasa afecta a la actividad enzimática.

La Tabla VIII muestra el efecto de las drogas sobre los niveles de actividad poli(A) polimerasa en el período de seis horas del tratamiento. Los cultivos controles muestran un descenso de unas 65 unidades/ 10^5 larvas como se había observado anteriormente. Sin embargo, este descenso de niveles no se encuentra en los cultivos de nauplias incubados en presencia de un inhibidor de la síntesis de proteínas, como la cicloheximida. Los inhibidores de la transcripción a nivel de DNA y de la RNA polimerasa II ensayados no parecen afectar cualitativamente al descenso de los niveles, si bien parecen tener un efecto cuantitativo sobre este descenso.

Estos experimentos de ninguna manera tienen carácter conclusivo dado el número de variables y parámetros colaterales que pueden afectar estas drogas, así como por la dificultad de una interpretación correcta de estos efectos. No obstante, los resultados obtenidos son compatibles con que el descenso de actividad poli(A) polimerasa después de la eclosión de las nauplias requiere la existencia de síntesis de proteína y no es únicamente consecuencia de un cese en la síntesis del enzima.

El que el proceso no se afecte en la misma medida por inhibidores de la síntesis protéica y de la síntesis de RNA (α -amanitina y Actinomicina D) puede deberse a diferentes causas. Una posible explicación es que los efectos derivados de una inhibi-

TABLA VIII. EFECTO DE DIFERENTES INHIBIDORES SOBRE LOS NIVELES DE ACTIVIDAD POLI(A) POLIMERASA EN NAUPLIAS DE Artemia

Tratamiento	Unidades/10 ⁵ nauplias	Variación (unidades)
Control T ₂₂	165	
Control T ₂₈	100	-65
Actinomicina D	115	-50
α-Amanitina	134	-31
Cicloheximida	160	- 5

ción de la síntesis de RNA requieren para manifestarse un tiempo mayor que las 6 horas de incubación que se utilizaron en este experimento. El efecto parcial de inhibición del descenso de la actividad enzimática que se observa con la alfa-amanitina parece apoyar esta hipótesis.

Slater y col. (1978) han estudiado los niveles de actividad poli(A) polimerasa en huevos de erizo de mar y en etapas posteriores de desarrollo del embrión. Estos autores han descrito un descenso en los niveles de actividad poli(A) polimerasa entre el huevo y la etapa de cuatro células, cuya actividad es la mitad de la presente en el huevo. Este descenso de actividad no ocurre cuando los huevos se incuban tras su fertilización en presencia de un inhibidor de la síntesis proteica como la hemetina. Estos resultados indican la existencia de un control negativo a nivel de traducción en los niveles de poli(A) polimerasa después de la fertilización, siendo coincidentes con los resultados que hemos expuesto para el caso de Artemia.

2. Estudio de la localización subcelular de la actividad poli(A) polimerasa durante el desarrollo de Artemia

Dentro de este apartado se describen los estudios realizados para conocer la distribución subcelular de la actividad poli(A) polimerasa durante el desarrollo postgastrular de Artemia. El interés de este estudio es doble. Por una parte permite conocer si el aumento de actividad observado en nauplias recién eclosionadas es debido a un incremento global en la célula o al aumento en una determinada fracción subcelular y por otra parte permite conocer los posibles cambios en localización para poder profundizar en la función fisiológica de la poli(A) polimerasa.

Embriones y larvas en diferentes estadios del desarrollo fueron homogenizados en un homogenizador manual de vidrio con

cinco volúmenes de un tampón conteniendo Hepes 25 mM pH 7,5, Cl_2Mg 5 mM, Cl_2Ca 0,5 mM, sacarosa 0,3 M y Ficoll400 al 15%. La obtención de las fracciones subcelulares se realizó siguiendo la pauta descrita por Marco y col. (1980). Las correspondientes fracciones se resuspendieron en tampón L y se utilizaron para determinar la actividad poli(A) polimerasa.

Independientemente del estadio de desarrollo estudiado sólo se detecta actividad poli(A) polimerasa de forma significativa en dos fracciones subcelulares, en la correspondiente a núcleos y plaquetas de vitelo y en la fracción soluble o citosólica.

La Tabla IX muestra la distribución de la actividad poli(A) polimerasa entre la fracción particulada (núcleos + plaquetas) y la fracción soluble.

La actividad poli(A) polimerasa aumenta cuatro veces en la fracción particulada durante el desarrollo embrionario postgastrular. En contraste, el incremento de la fracción soluble llega al doble durante este mismo período. A partir de la eclosión se observa un descenso de la actividad en las dos fracciones, pero manteniendo el mismo porcentaje de distribución del 50% de la actividad en cada una de las dos fracciones. Una interesante conclusión de estos estudios es que el incremento de actividad poli(A) polimerasa que tiene lugar durante el desarrollo embrionario postgastrular se debe fundamentalmente a un aumento del enzima en la fracción particulada. Es también de destacar que las gástrulas enquistadas contienen más del 70% del enzima en la fracción soluble.

La interpretación de los datos de distribución subcelular de la poli(A) polimerasa no es sencilla puesto que esta actividad puede estar implicada en distintos procesos de poliadenilación. Así por ejemplo, se han descrito procesos de elongación de la cadena poliadenílica de mRNAs localizados en el citoplas-

TABLA IX. DISTRIBUCION SUBCELULAR DE LA POLI(A) POLIMERASA
DURANTE EL DESARROLLO TEMPRANO DE Artemia

<u>Horas de desarrollo</u>	Poli(A) polimerasa: Unidades/10 ⁵ animales	
	<u>Fracción particulada</u>	<u>Fracción soluble</u>
0	20	50
5	25	47
10	35	46
18	80	85
24	72	70
30	50	50

ma (Dolecki y col., 1977; Wilt, 1977) y la síntesis de la cadena poliadenílica de mRNA que ocurre en el núcleo de las células muy poco después de la síntesis del mRNA (Weinberg, 1973; Nevins y Darnell, 1978). Por lo tanto es lógico la presencia de esta actividad enzimática tanto en el núcleo de las células como en el citoplasma.

La presencia mayoritaria de la poli(A) polimerasa en la fracción soluble en los embriones puede interpretarse en relación con los procesos de poliadenilación que pueden tener lugar en los RNA mensajeros acumulados en el citoplasma y el mantenimiento de unos niveles relativamente altos de la actividad poli(A) polimerasa citosólica puede relacionarse con un intenso metabolismo de las cadenas poliadenílicas de los RNAs mensajeros. Por otra parte, el aumento de actividad enzimática en la fracción particulada especialmente al final del período embrionario postgastrular anterior a la eclosión de las nauplias puede estar relacionado con un intenso período de transcripción y síntesis de RNA mensajeros, lo que precisa de una intensa actividad de poliadenilación en el núcleo. En este contexto debe señalarse que esta etapa del desarrollo se caracteriza por la existencia de una intensa morfogénesis y cambios estructurales en el embrión para dar lugar a las larvas nadadoras.

El aumento de actividad poli(A) polimerasa durante el período embrionario postgastrular y la diferente localización subcelular de la actividad plantea el problema de si la actividad presente en las dos fracciones se debe a un mismo enzima o a dos isoenzimas diferentes. Para tratar de contestar a este problema se han realizado una serie de estudios que se describen en el apartado siguiente.

3. Estudios comparativos de las poli(A) polimerasas presentes en la fracción soluble y particulada de nauplias de Artemia

En algunos sistemas se ha descrito la existencia de distintos isoenzimas con actividad poli(A) polimerasa, y en algunos casos estos isoenzimas tienen diferente localización subcelular (Haff y Kelleer, 1975; Rose y Jacob, 1976 a; Rose y Jacob, 1976 b; Nevins y Joklik, 1977).

Nuestros estudios en quistes de Artemia no nos han permitido identificar más de una actividad enzimática en este sistema como se ha expuesto anteriormente. Sin embargo, la diferencia en el comportamiento de la actividad poli(A) polimerasa particulada y soluble durante el desarrollo plantea la posibilidad de que en las nauplias se hubiera inducido de forma diferencial un isoenzima presente en la fracción particulada, hipótesis que justificaría el aumento preponderante de la actividad poli(A) polimerasa en esta fracción subcelular durante el período de la eclosión.

3.a. Estudio de las propiedades de la actividad poli(A) polimerasa en extractos totales de nauplias

Como primer paso en el estudio de esta hipótesis, se examinaron algunas propiedades de la actividad poli(A) polimerasa presente en extractos totales de nauplias de 18 horas de desarrollo.

Para realizar estos estudios se homogenizaron las nauplias en un medio de alta fuerza iónica (Tampón BH), el cual permite solubilizar la totalidad de la actividad poli(A) polimerasa, obteniéndose en el sobrenadante de la centrifugación a 105.000xg

durante 2 horas.

En este extracto soluble se estudiaron tres propiedades: pH óptimo de la actividad poli(A) polimerasa, sensibilidad térmica del enzima y su punto isoeléctrico. La figura 24 muestra la curva de actividad enzimática en función del pH del medio de ensayo. Como puede verse, el enzima presenta un único pH óptimo, que es 8,5, el cual es idéntico al que presenta el enzima purificado de quistes. La curva de dependencia del pH es, por otra parte, bastante simétrica.

La figura 25 muestra la curva de sensibilidad térmica del enzima. El enzima se incubó a la temperatura indicada en cada caso durante 5 minutos, ensayándose a continuación la actividad enzimática según lo descrito en Material y Métodos. Tampoco en este caso se presenta ninguna heterogeneidad en el comportamiento de la actividad enzimática. Llama la atención la gran sensibilidad del enzima a la temperatura, inactivándose en un 50% al icubar el extracto 5 minutos a 36°C. Estas incubaciones se hicieron en presencia del inhibidor de tripsina de la soja para evitar la degradación del enzima por las proteasas presentes en las nauplias de Artemia (Osuna y col., 1977).

Por último, el extracto total de nauplias se sometió a isoelectroenfoque en columna. El método experimental fué similar al empleado para el enzima parcialmente purificado de quistes y que se ha descrito anteriormente. Se sometieron a isoelectroenfoque 2 ml de extracto total, recogiendo fracciones de 2 ml en las cuales se valoró la actividad poli(A) polimerasa en las condiciones descritas en Material y Métodos, utilizando como iniciador RNA de Tórula o ácido poliadenílico. Los picos de actividad con ambos iniciadores coincidieron. El resultado obtenido utilizando poli(A) como iniciador es el que se muestra en la figura 26. La actividad poli(A) polimerasa presenta un único punto isoeléctrico, muy bien delimitado, que resultó ser de

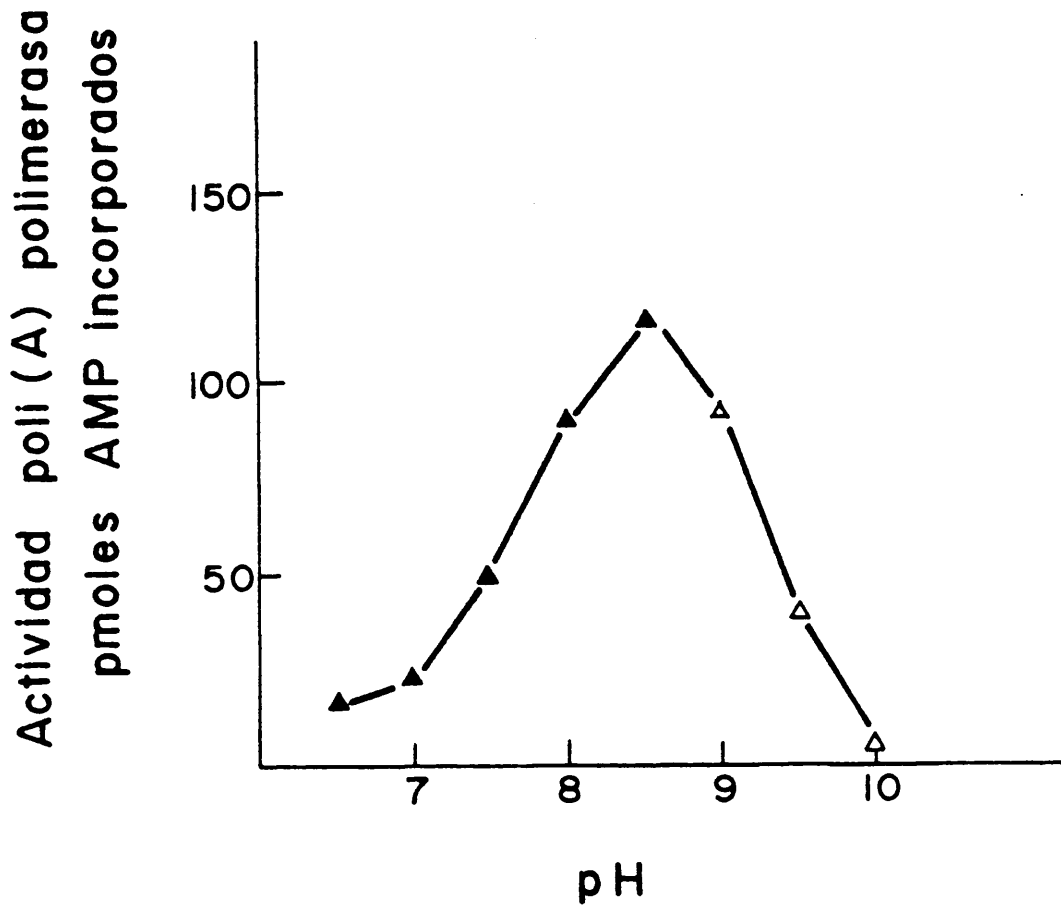


Figura 24. Variación de la actividad poli(A) polimerasa de extractos de nauplias en función del pH

Se ensayó la actividad poli(A) polimerasa de extractos totales de nauplias de 18 horas. Las condiciones de ensayo fueron las descritas en Material y Métodos excepto por el tampón que fué sustituido por dos tampones a diferentes pHs: Tris-ClH 100 mM (▲) y Glicina-NaOH, 100 mM (△).

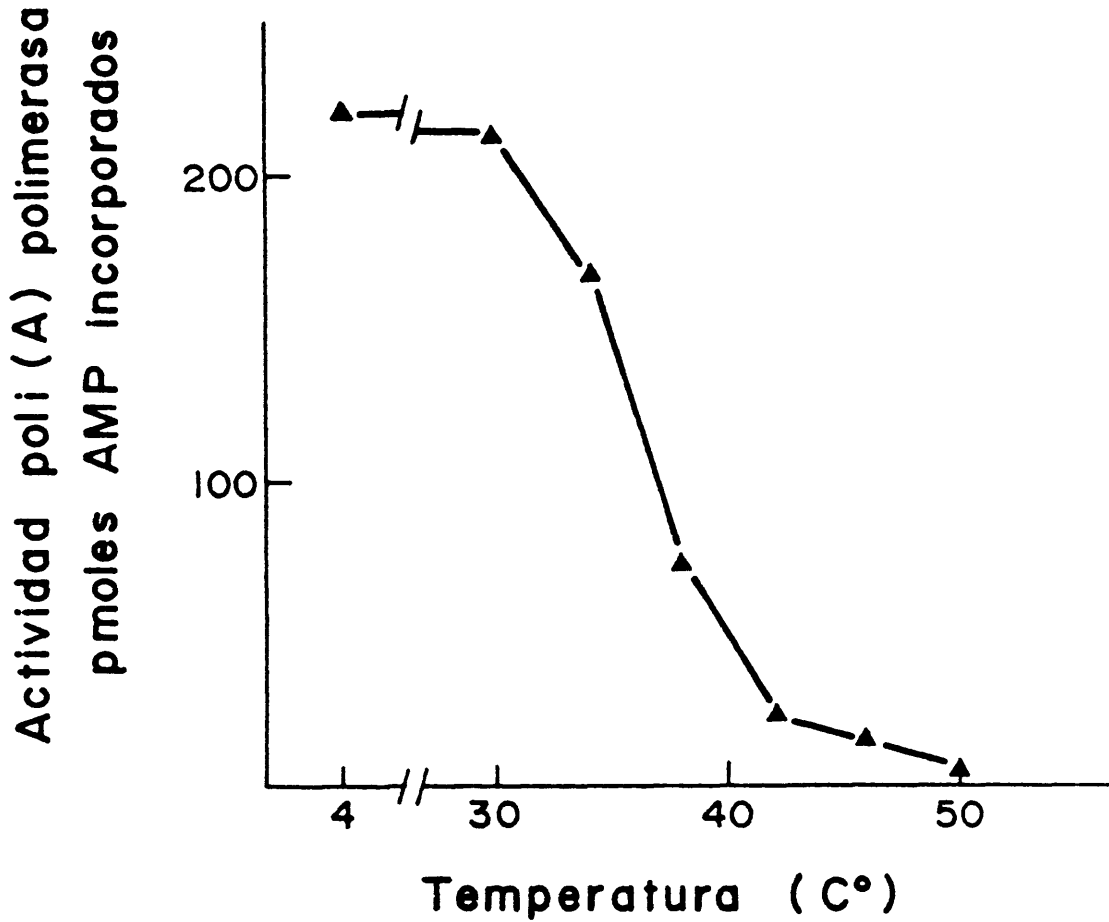


Figura 25. Sensibilidad térmica de la actividad poli(A) polimerasa de extractos de nauplias

Diversas alícuotas de un extracto total de nauplias se incubaron durante 5 minutos a diferentes temperaturas. Al cabo de este tiempo las alícuotas fueron enfriadas hasta 0°C y se ensayó su actividad poli(A) polimerasa en las condiciones descritas en Material y Métodos.

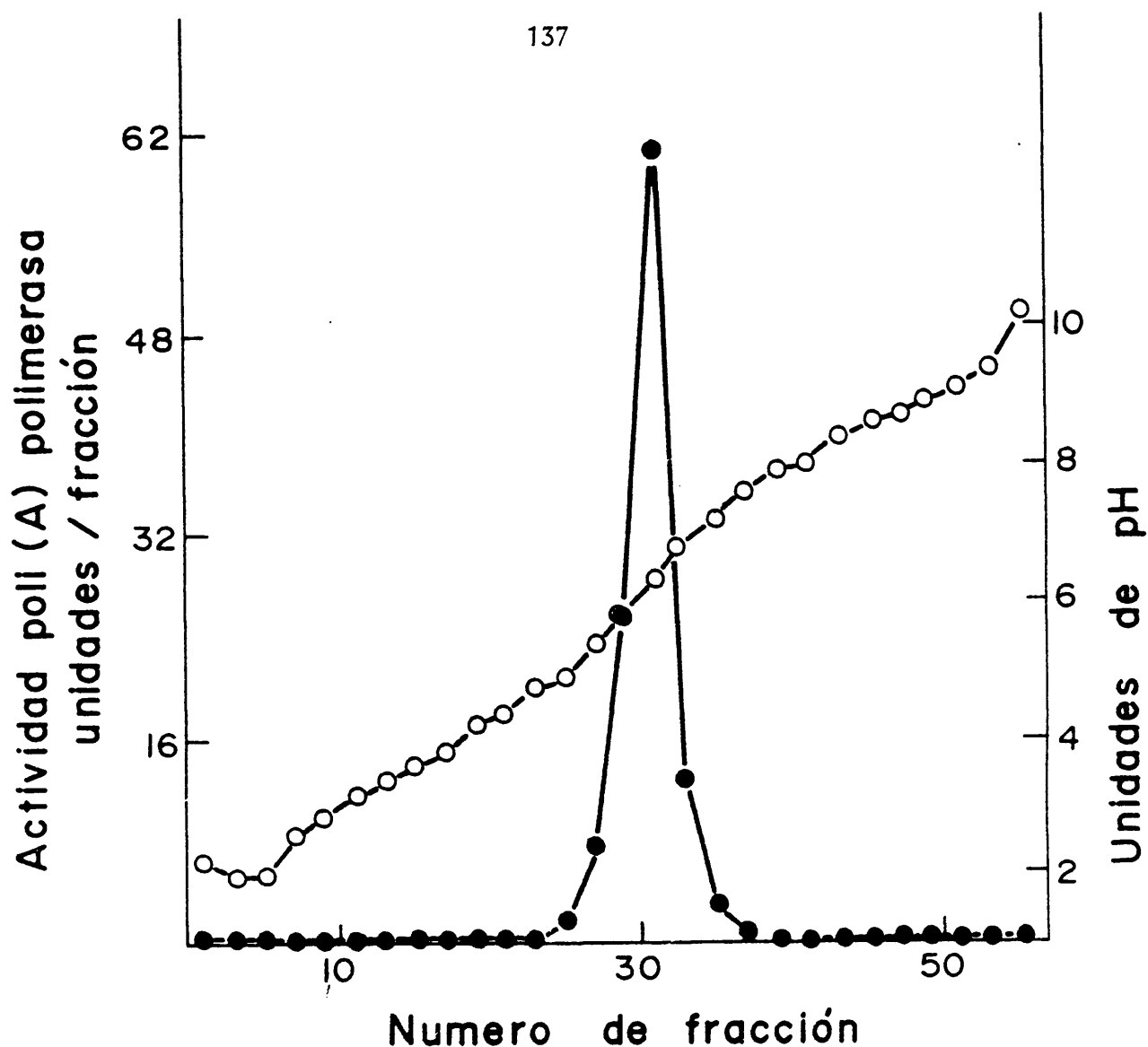


Figura 26. Isoelectroenfoque de la actividad poli(A) polimerasa de extractos de nauplias

Una alícuota de 2 ml de un extracto total de nauplias fué sometida a isoelectroenfoque en columna. Se utilizó una columna de 105 ml y un gradiente de sacarosa del 5 al 50%. Se utilizó un afolito de pH 3 a 10, diluido al 2,5%. La columna se sometió a una diferencia de potencial de 1.200 V durante 60 horas a 0°C. La columna se fraccionó por su parte inferior, recojiéndose fracciones de 1,5 ml. En cada fracción se determinó el pH (○) y la actividad poli(A) polimerasa (●).

aproximadamente 6. Este punto isoeléctrico coincide con el determinado anteriormente para el enzima parcialmente purificado de quistes.

Se han estudiado también las propiedades cromatográficas de la actividad poli(A) polimerasa presente en los extractos totales. Estas propiedades son similares a las estudiadas para el enzima presente en quistes. Así por ejemplo, la actividad presente en nauplias no se retiene en las columnas de afinidad ensayadas, pero sí lo hace en las de DEAE-celulosa y Bio-Rex. La figura 27 muestra los perfiles de elución de la actividad poli(A) polimerasa en las columnas de DEAE-celulosa (panel superior) y Bio-Rex (panel inferior). En este experimento se partió de 5 gramos de nauplias de 18 horas, las cuales fueron homogeneizadas en tampón BH. El extracto soluble se pasó a través de una columna de 20 ml de DEAE-celulosa, previa diálisis frente a tampón BL + ClK 10 mM. Una vez aplicada la muestra, la columna se lavó con 15 ml de tampón BL + ClK 10 mM y se aplicó un gradiente de 50 por 50 ml de tampón BL con ClK cuya concentración variaba de 10 mM a 0,3 M. Se recogieron fracciones de 3 ml en las cuales se valoró la actividad poli(A) polimerasa según el método descrito en Material y Métodos.

Las fracciones de la columna de DEAE-celulosa que tenían actividad poli(A) polimerasa fueron recogidas, diluidas con tampón BL hasta una concentración de 20 mM de ClK y pasadas a través de una columna de 20 ml de Bio-Rex 70. Tras la aplicación de la muestra la columna se lavó con 25 ml de tampón BL + ClK 20 mM y se aplicó un gradiente de 50 por 50 ml de tampón BL conteniendo ClK entre 20 mM y 0,5 mM. Se recogieron fracciones de 3 ml y se valoró la actividad poli(A) polimerasa como en el caso anterior.

En ambas columnas la actividad poli(A) polimerasa se eluye en un solo pico de actividad, simétrico, sin que puedan identificarse más de un isoenzima diferente. Las propiedades cromatográficas

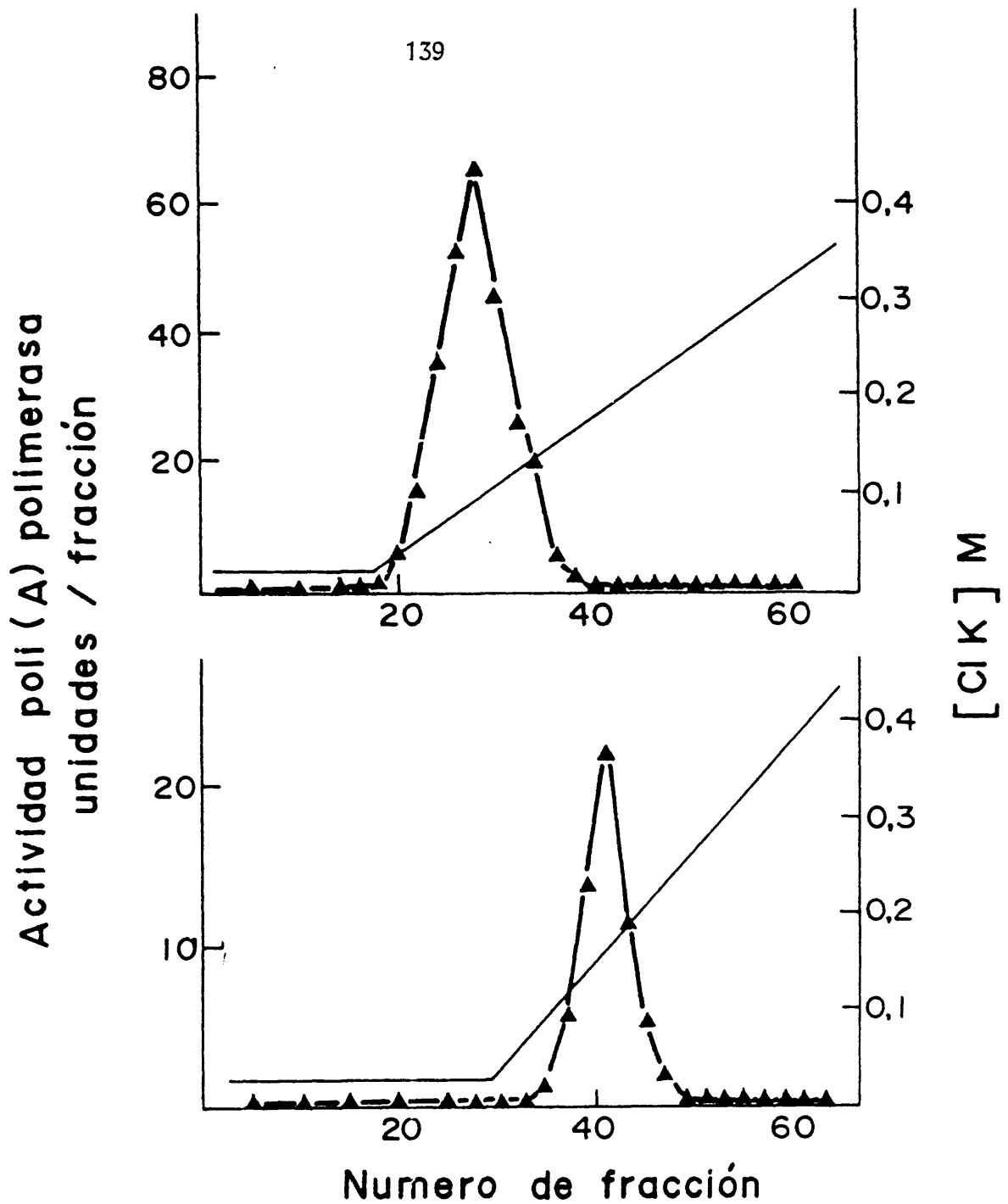


Figura 27. Cromatografía en DEAE-celulosa (arriba) y Bio-Rex 70 (abajo) de la poli(A) polimerasa de extractos totales de nauplias

Alicuotas de extractos totales de nauplias fueron sometidas a cromatografía de intercambio iónico en columnas de DEAE-celulosa y Bio-Rex 70 en las condiciones que se describen en el texto.

tográficas de esta actividad son, además, muy similares a las de la actividad presente en quiste, eluyendo a una concentración de ClK de 80 mM en el caso de la DEAE-celulosa y de 0,15 -0,2 M en el caso del Bio-Rex.

En ninguno de los dos casos se eluyó más actividad poli(A) polimerasa lavando las columnas con tampón BL con ClK 1 M.

Ninguna de las características generales estudiadas en extractos totales de nauplias permite diferenciar más de un iso-enzima con actividad poli(A) polimerasa. En consecuencia, para profundizar más en este problema se ha realizado un estudio comparativo de los enzimas parcialmente purificados a partir de las fracciones particulada y soluble.

3.b. Purificación parcial y caracterización de las actividades poli(A) polimerasas presentes en las fracciones particuladas y solubles de nauplias

La purificación parcial y caracterización de estas actividades ha tenido por objeto no sólo estudiar la posible heterogeneidad del enzima(s) presente en nauplias, sino también comparar la(s) actividad(es) presente(s) en nauplias con el enzima caracterizado en embriones enquistados.

3.b.1. Purificación de la poli(A) polimerasa de nauplias

El esquema de purificación de las poli(A) polimerasas de ambas fracciones subcelulares de nauplias es muy similar al seguido en quistes y consta de tres etapas: cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa, precipitación fraccionada con sulfato amónico y filtración de Sephadex G-150.

Se partió de 50 gramos de nauplias de 18 horas, las cuales fueron homogenizadas en un Potter mecánico.

La fracción constituida por núcleos y plaquetas de vitelo se resuspendió en 50 ml de tampón BH y se volvió a homogenizar en el Potter mecánico para solubilizar la actividad poli(A) polimerasa. Posteriormente este homogenado se centrifugó a 6.000xg durante 20 minutos; el sobrenadante de esta centrifugación constituye la fracción particulada solubilizada, la cual contiene la totalidad de la actividad poli(A) polimerasa presente originalmente en la fracción particulada.

El material de partida de las dos purificaciones fué: la fracción particulada solubilizada dializada frente a tampón BL + ClK 10 mM y, por otra parte, la fracción soluble, dializada igualmente durante una noche frente a tampón BL + ClK 10 mM. Ambas fracciones fueron sometidas al mismo proceso de purificación, el cual constó de los siguientes tres pasos:

1) Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa. Se utilizaron sendas columnas 50 ml de DEAE-celulosa equilibradas con tampón BL conteniendo 10 mM de ClK. Tras el paso de la muestra la columna se lavó con 25 ml de tampón BL + ClK 10 mM, aplicándose a continuación un gradiente de 75 x 75 ml de tampón BL con ClK de 10 mM hasta 0,5 M. Se recogieron fracciones de 3 ml.

2) Precipitación fraccionada con sulfato amónico. Las fracciones de la cromatografía en DEAE-celulosa que tenían actividad poli(A) polimerasa fueron reunidas y se procedió a la precipitación fraccionada de las proteínas con sulfato amónico. La mayor parte de la actividad poli(A) polimerasa, tanto de la fracción particulada como de la fracción soluble, se recuperó en la fracción de proteínas que precipitan entre el 45 y el 60% de saturación de sulfato amónico. En los quistes la actividad

poli(A) polimerasa precipita entre el 30 y el 45% de saturación de sulfato amónico.

3) Gel-filtración a través de Sephadex G-150. Se utilizó una columna de 90 x 1,5 cm de Sephadex G-150 equilibrada con tampón BL al que se había suprimido el glicerol. Se recogieron fracciones de 2,5 ml, valorándose en ellas la actividad poli(A) polimerasa. Las fracciones que tenían actividad fueron reunidas y la proteína precipitada por adición de sulfato amónico hasta un 75% de saturación. El precipitado de proteínas fué posteriormente resuspendido en un pequeño volumen de tampón BL, sin pérdida de actividad. Este paso de concentración de la actividad es necesario para los experimentos de caracterización del enzima.

Las Tablas X y XI muestran los resultados de la purificación. Se consigue una purificación de unas 70 veces para el enzima soluble y unas 60 veces para el enzima particulado. El rendimiento es del 70% para el enzima soluble y de un 17% para el particulado, debido al bajo rendimiento de los dos últimos pasos de purificación, la precipitación con sulfato amónico y la cromatografía de gel filtración. Cabe destacar el similar comportamiento de la actividad enzimática poli(A) polimerasa de ambas fracciones subcelulares a lo largo de todo el proceso de purificación.

3.b.2. Caracterización de los enzimas parcialmente purificados

Una vez purificada parcialmente la actividad poli(A) polimerasa de ambas fracciones subcelulares, se realizaron diversos experimentos con el fin de conocer las características de ambas actividades. Las características estudiadas fueron las siguientes:

TABLA X. PURIFICACION DE LA ACTIVIDAD POLI(A) POLIMERASA DE LA FRACCION
PARTICULADA DE NAUPLIAS DE Artemia

Fracción	Volumen ml	Proteína mg/ml	Actividad total unidades	Actividad específica unid./mg	Rendimiento %
Extracto solubilizado	50	27	2597	1,9	
DEAE-celulosa	70	4	3895	14	150
45-60% Sulfato amónico	2	30	1636	27	63
Sephadex G-150	40	0,1	440	110	17

TABLA XI. PURIFICACION DE LA ACTIVIDAD POLI (A) POLIMERASA DE LA FRACCION
 SOLUBLE DE NAUPLIAS DE Artemia

Fracción	Volumen ml	Proteína mg/ml	Actividad total unidades	Actividad específica unid./mg	Rendimiento %
Fracción soluble	170	3,9	2985	4,5	
DEAE-celulosa	80	1,2	3116	33	105
45-60% Sulfato amónico	2	13	2574	99	86
Sephadex G-150	45	0,16	2180	302	73

a) Especificidad de metal divalente. El interés de este estudio se basa en que alguno de los isoenzimas descritos en otros sistemas difieren en el metal divalente con el que el enzima presenta máxima actividad, así por ejemplo en células Hela infectadas con virus Vaccinia, uno de los isoenzimas es estimulado por manganeso, pero no por magnesio, mientras que los otros dos isoenzimas pueden ser estimulados por uno u otro metal (Nevins y Joklik, 1977). En la Tabla XII se presenta la actividad obtenida con los enzimas parcialmente purificados de las fracciones particulada y soluble en presencia de los cloruros de cuatro metales divalentes. Se presentan también los datos obtenidos con el enzima de embriones. Como puede verse, la dependencia de metales de ambas actividades es similar, presentando un máximo de actividad en presencia de manganeso. Con magnesio se obtiene entre un 6 y un 10% de la actividad con manganeso. La actividad es prácticamente indetectable en presencia de calcio. Por otra parte, este cuadro de especificidad es igual al que presenta la poli(A) polimerasa purificada de quistes.

b) Especificidad de sustrato. Las poli(A) polimerasas parcialmente purificadas se ensayaron en las condiciones descritas en Material y Métodos, con diferentes nucleósidos o deoxinucleósidos trifosfato. En todos los casos la concentración ensayada fué de 0,15 mM y el nucleótido presente en el ensayo estaba marcado radioactivamente con ^3H , excepto el ITP que estaba marcado con ^{14}C . La Tabla XIII muestra los resultados obtenidos, expresando la actividad enzimática observada en cada caso como el tanto por ciento que representa con respecto a la actividad con ATP como sustrato. Las fracciones purificadas a partir de ambas fracciones subcelulares presentan actividad polimerasa únicamente con ATP y dATP como sustratos, siendo la actividad con dATP un 4% con el enzima de la fracción soluble y un 14% con él de la particulada. Estos datos son cualitativamente similares a los obtenidos con enzima parcialmente purificado de quistes, permitiéndonos descartar la posibilidad de que la

TABLA XII. ESPECIFICIDAD DE METAL DE LAS POLI(A) POLIMERASAS
DE NAUPLIAS Y EMBRIONES DE Artemia

Metal	% Actividad poli(A) polimerasa		
	<u>Enzima de Nauplias</u>		<u>Enzima de</u>
	<u>Particulada</u>	<u>Soluble</u>	<u>Embriones</u>
Manganeso	100	100	100
Magnesio	10	6	7
Cobalto	7	6	6
Calcio	< 1	< 1	< 1

TABLA XIII. ESPECIFICIDAD DE NUCLEOTIDOS DE LAS POLI(A)
POLIMERASAS DE NAUPLIAS DE Artemia

Nucleótido	% Actividad Poli(A) polimerasa	
	<u>Enzima Particulada</u>	<u>Enzima Soluble</u>
ATP	100	100
CTP	< 1	< 1
GTP	< 1	< 1
UTP	< 1	< 1
ITP	< 1	< 1
dATP	14	4

actividad purificada a partir de las dos fracciones correspondiera a una t-RNA nucleotidil transferasa o a una homopolímero polimerasa.

En cuanto a la actividad con dATP debe señalarse las diferencias de tipo cuantitativo observadas. La actividad con dATP representa el 14% de la obtenida con ATP para el enzima purificado a partir de la fracción particulada de nauplias, el 4% para el purificado a partir de la fracción soluble de nauplias, y el 18% para el enzima purificado a partir de quistes.

c) Especificidad de iniciador. Otra de las características que diferencia entre sí los distintos isoenzimas de las células HeLa infectadas por virus es su capacidad para utilizar diferentes moléculas de RNA como iniciadores. Uno de los isoenzimas utiliza como iniciador RNA pero no ácido poliadenílico, mientras que otros isoenzimas utilizan ambas moléculas como iniciadores (Nevins y Joklik, 1977). Iguales diferencias existen entre los isoenzimas de levadura (Haff y Keller, 1975) y núcleos de hígado de rata (Niessing, 1975).

La Tabla XIV muestra la especificidad de RNA iniciador de los enzimas parcialmente purificados. Las actividades purificadas a partir de ambas fracciones subcelulares presenta los mismos requerimientos en cuanto al iniciador. Ambas actividades reproducen, además, una característica peculiar de la poli(A) polimerasa de quistes, presentan el máximo de actividad con RNA de Tórula y poli(A), y no tienen actividad con otros ribohomopolímeros, como el poli(C) y el poli(U).

Se ha encontrado que las actividades relativas de la poli(A) polimerasa de ambas fracciones con RNA y poli(A) como iniciadores varían con la concentración de sulfato amónico presente en el ensayo. Los enzimas presentan un óptimo de actividad a

TABLA XIV. ESPECIFICIDAD DE RNA INICIADOR DE LAS POLI(A)
POLIMERASAS DE NAUPLIAS DE Artemia

RNA Iniciador	% Actividad poli(A) polimerasa	
	<u>Enzima particulado</u>	<u>Enzima soluble</u>
RNA de <u>Tórula</u>	100	100
poli(A)	52	54
poli(C)	8	3
poli(U)	< 1	< 1
DNA cadena simple	< 1	< 1

una concentración de 0,04 M de sulfato amónico, cuando se utiliza RNA de Tórula como iniciador y de 0,08-0,1 M cuando se utiliza poli(A). Esto hace que la relación de actividades cuando se utilizan como iniciadores RNA y poli(A) dependa de la concentración de sulfato amónico en el medio de ensayo. La Tabla XV muestra la relación de actividades con RNA y con poli(A) como iniciador para los enzimas purificados a partir de las fracciones particulada y soluble de nauplias. El efecto del sulfato amónico es igual para las actividades purificadas a partir de estas fracciones. Este efecto del sulfato amónico hace que la relación de actividad con RNA y poli(A) de una preparación de enzima dependa de la concentración de sal, pudiendo variar, sobre todo en las fracciones resultantes de una precipitación con sulfato amónico.

d) Dependencia de la actividad enzimática con la cantidad de enzima presente en el ensayo. En la poli(A) purificada a partir de quistes se pudo observar que la actividad enzimática detectada no era línealmente proporcional a la cantidad de enzima presente en el ensayo, fenómeno que sólo se presenta a partir de cierto paso de purificación del enzima (la precipitación fraccionada con sulfato amónico). En las actividades poli(A) polimerasa purificadas a partir de nauplias ocurre el mismo fenómeno a partir del paso de precipitación fraccionada con sulfato amónico. La actividad enzimática no es directamente proporcional a la cantidad de enzima presente en el ensayo. La figura 28 muestra el efecto de la cantidad de enzima sobre la actividad de los enzimas parcialmente purificados a partir de las fracciones particulada y soluble de nauplias.

e) Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática. Como se ha expuesto anteriormente, la poli(A) polimerasa de quistes presenta un efecto de inhibición por sus-

TABLA XV. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE SULFATO AMONICO SOBRE LA RELACION DE ACTIVIDADES DE LAS POLI(A) POLIMERASAS DE NAUPLIAS CON RNA Y POLI(A) COMO INICIADORES

Sulfato amónico (mM)	Relación de actividad con RNA/poli(A)	
	Enzima particulado	Enzima soluble
0	2,0	2,4
30	1,5	1,4
60	0,8	1,2
100	0,4	0,7
150	0,3	0,8

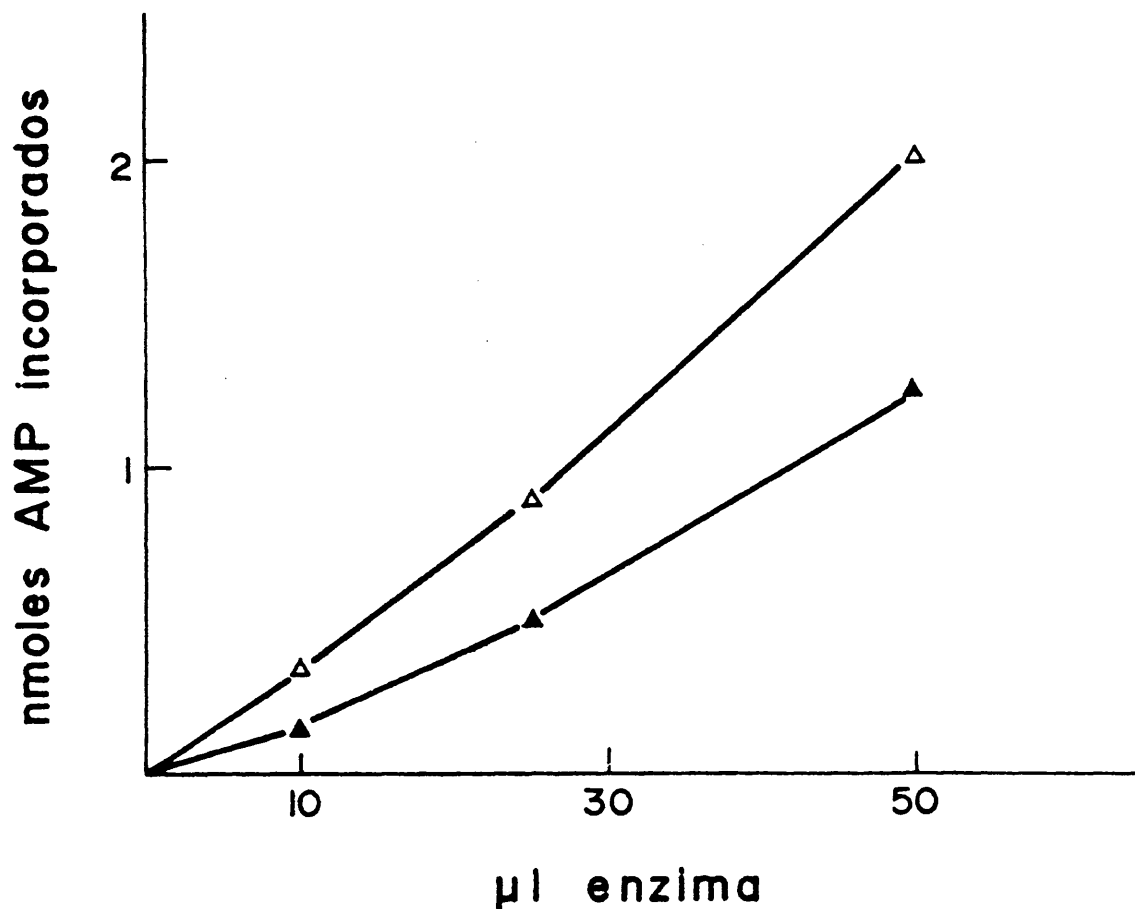


Figura 28. Efecto de la cantidad de enzima sobre la actividad poli(A) polimerasa de nauplias

Se ensayó la actividad de diversas cantidades de poli(A) polimerasa parcialmente purificada a partir de las fracciones particulada (Δ) y soluble (\blacktriangle) de nauplias de *Artemia*. Los ensayos se realizaron en las condiciones descritas en Material y Métodos durante 30 minutos.

trato, efecto que parece ser debido a que el sustrato (ATP) puede ocupar el sitio de interacción del iniciador con el enzima. Hemos investigado si los enzimas purificados a partir de nauplias presentaban también esta propiedad. La figura 29 muestra las gráficas obtenidas al estudiar el efecto de la concentración de ATP sobre la actividad poli(A) polimerasa de ambas fracciones. En ambos casos se presenta el fenómeno de inhibición por sustrato. Por otra parte, a partir de estas gráficas es posible determinar las constantes de Michaelis para ambas actividades, siendo de $40 \mu\text{M}$ para el enzima soluble y de $60 \mu\text{M}$ para el particulado.

Con el fin de estudiar más detalladamente el efecto de inhibición por sustrato, se ha efectuado los correspondientes representaciones de Hill. Los resultados obtenidos con el enzima soluble y particulado se muestran en la figura 30. A partir de estos datos se pudo determinar una constante de inhibición de 1 mM para el enzima particulado, siendo la pendiente de la recta de $1,1$, lo cual viene a indicar que no existe cooperatividad en la inhibición. Para el enzima soluble la constante de inhibición es también de 1 mM y la pendiente de la recta de $1,2$, por lo que se concluye que tampoco existe cooperatividad en la inhibición. La inhibición, en ambos casos, se ajusta a un modelo no cooperativo. Todos estos datos son coincidentes con los que se dedujeron para el enzima purificado a partir de quistes.

f) Longitud de la cadena poliadenílica sintetizada. Se ha estudiado la longitud de la cadena poliadenílica sintetizada por los enzimas purificados a partir de las fracciones particulada y soluble de quistes. Este estudio se ha hecho en presencia de dos iniciadores, RNA de Tórula y poli(A). Las incubaciones fueron de 30 minutos, al cabo de los cuales las mezclas de ensayo se sometieron a hidrólisis alcalina, siendo posteriormente neutralizadas las muestras y separados sus componentes por

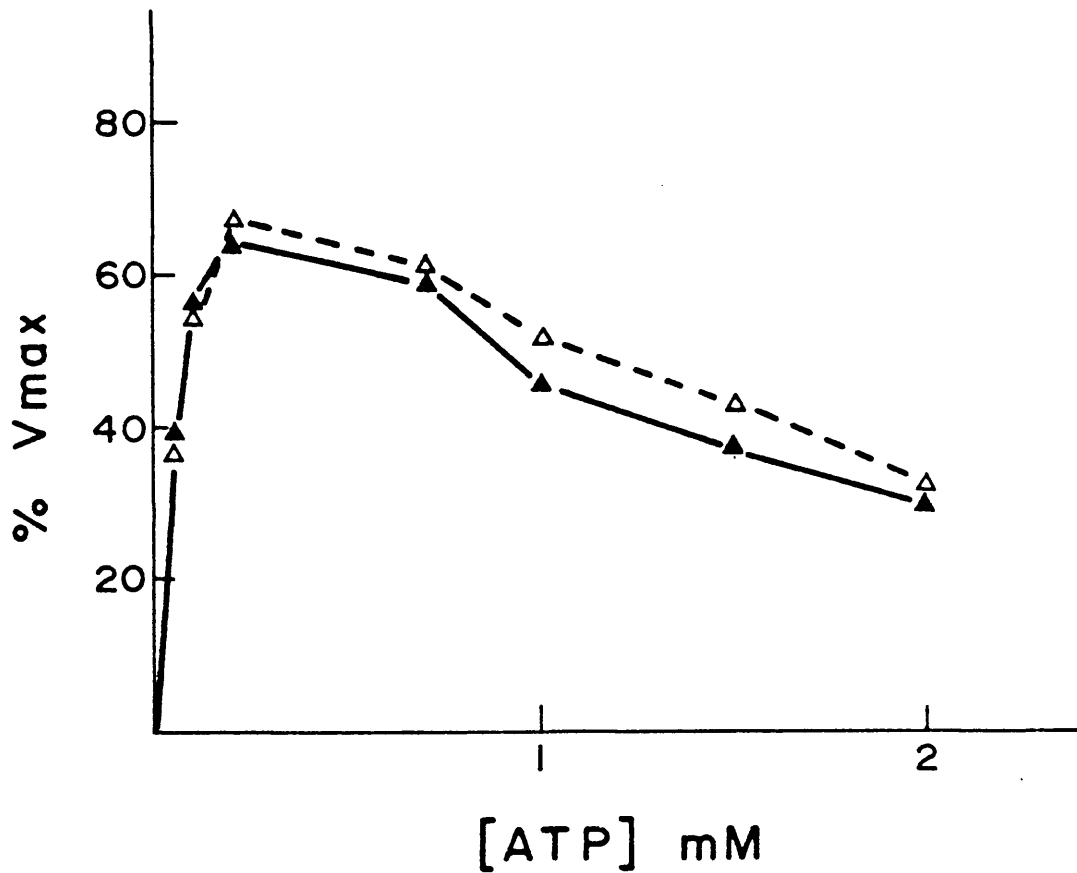


Figura 29. Efecto de la concentración de ATP sobre la actividad poli(A) polimerasa de nauplias

Se ensayó el efecto de diferentes concentraciones de ATP sobre la actividad poli(A) polimerasa de nauplias. Se emplearon preparaciones de enzima parcialmente purificado a partir de las fracciones particulada (Δ) y soluble (\blacktriangle). Se utilizó RNA de Tórula como iniciador. La concentración de Cl_2Mn en cada ensayo fué 2 mM por encima de la concentración de ATP.

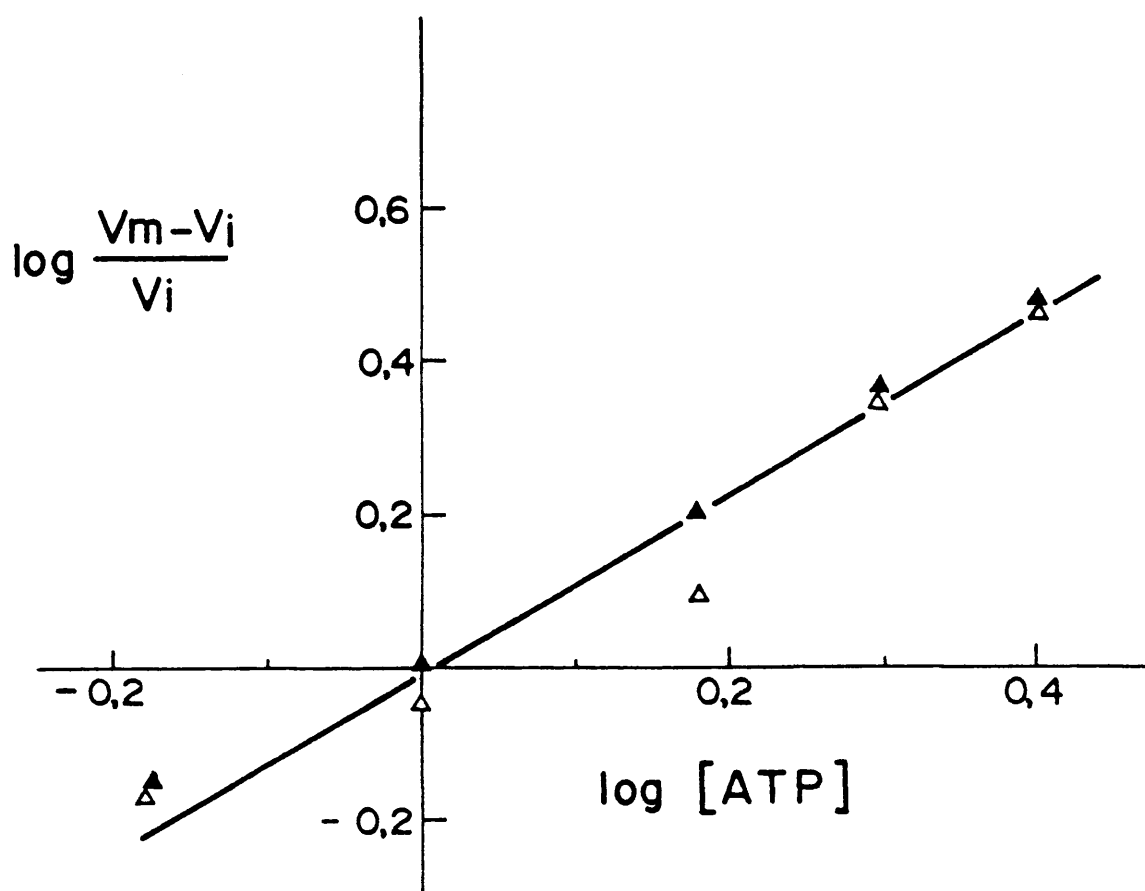


Figura 30. Representación de Hill de la inhibición por ATP de la poli(A) polimerasa de nauplias

Se ensayó el efecto de la concentración de ATP sobre la actividad poli(A) polimerasa del enzima de nauplias. El estudio se realizó utilizando preparaciones parcialmente purificadas de los enzimas existentes en las fracciones particulada (Δ) y soluble (\blacktriangle). Las condiciones de ensayo fueron las especificadas en la Figura 29. La V_{\max} se calculó por extrapolación a partir de los datos de actividad a concentraciones de ATP inferiores a 0,25 mM.

cromatografía de capa fina en PEI-celulosa, tal como se ha descrito en Material y Métodos. A partir de los datos de radioactividad en adenosina y adenosina monofosfato se pudo calcular la longitud de la cadena poliadenílica sintetizada. Para el enzima purificado a partir de la fracción particulada la longitud fué de 4 nucleótidos, tanto con RNA como con poli(A) como iniciadores. Para el enzima purificado a partir de la fracción soluble la longitud fué de 6 nucleótidos cuando se utilizó RNA como iniciador y de 4 nucleótidos cuando se utilizó poli(A). Estos datos indican que el tamaño de las cadenas de poli(A) son esencialmente los mismos para los enzimas purificados de las fracciones particuladas y solubles de nauplias y para el enzima purificado de quistes.

Como resumen de los estudios de heterogeneidad de la actividad poli(A) polimerasa presente en nauplias de Artemia, se puede concluir que la mayoría de los datos obtenidos nos muestra que la actividad se comporta de forma homogénea, tanto en las propiedades generales de los extractos totales, como en las propiedades enzimáticas de los enzimas purificados a partir de las fracciones subcelulares particulada y soluble. Solamente hemos encontrado pequeñas diferencias en la capacidad de utilización del dATP como sustrato. Creemos que estas diferencias no son significativas frente al resto de las propiedades estudiadas, siendo además diferencias pequeñas, que lo más probable se deban a errores experimentales. Por lo tanto, hemos de concluir que no tenemos ningún dato que nos permita afirmar la existencia de diferentes enzimas con actividad poli(A) polimerasa en Artemia, sin que esto quiera decir que podamos excluir dicha posibilidad, pues pudiera ser que existieran diferentes isoenzimas con propiedades muy parecidas, o bien que en el proceso de purificación de la actividad poli(A) polimerasa se haya perdido uno de los isoenzimas, posibilidad que debe considerarse a la vista del bajo rendimiento del proceso de purificación de la actividad procedente de la fracción particulada.

Por otra parte, las propiedades descritas para los enzimas purificados a partir de nauplias coinciden con las expuestas para el enzima parcialmente purificado a partir de quistes.

C. METABOLISMO DEL ACIDO POLIADENILICO DURANTE EL
DESARROLLO EMBRIONARIO DE Artemia

Una vez conocidas algunas de las propiedades más significativas de la actividad poli(A) polimerasa, tanto en embriones enquistados como en las etapas posteriores de diferenciación de Artemia, se ha considerado de interés el estudio del papel fisiológico que desempeñaban los procesos de poliadenilación durante la activación y el subsiguiente desarrollo embrionario.

Como se ha señalado en la introducción, el papel fisiológico que se le supone a las poli(A) polimerasas es la síntesis de la cola de ácido poliadenílico presente en el extremo 3' de gran parte de los RNAs mensajeros. En consecuencia, el estudio de la función fisiológica de las poli(A) polimerasas requiere un conocimiento previo del metabolismo de estos segmentos poliadenílicos, producto de la actividad del enzima. Se ha investigado la distribución subcelular del ácido poliadenílico en los embriones enquistados, su asociación a otros componentes bioquímicos y su variación durante el desarrollo embrionario postgastrolar.

1.- Cuantificación y distribución subcelular del ácido poliadenílico en embriones enquistados de Artemia

La existencia de RNA poliadenilado en embriones enquistados de Artemia ha sido previamente puesto de manifiesto por diferentes autores (Grosfeld y Littauer, 1975; Felicetti y col., 1975; Nilsson y Hultin, 1975).

El estudio de la cuantificación y distribución del ácido poliadenílico se ha realizado tras la homogenización de los embriones y posterior centrifugación diferencial para obtener las

diferentes fracciones celulares. Los quistes se trataron con hipoclorito sódico al 5% y se homogenizaron en tampón BSM como se describe en Material y Métodos. Se obtuvieron tres fracciones, la fracción núcleo-plaquetaria, la fracción de membranas y mitocondrias, y la fracción posmitocondrial compuesta por el citosol y la fracción microsomal.

Las fracciones de núcleos+plaquetas y mitocondrias+membranas fueron resuspendidas en 10 ml del tampón BSM. A las tres fracciones subcelulares se les añadió dodecil sulfato sódico hasta alcanzar una concentración del 0,5% (peso/volumen) y fueron sometidas a tratamiento con 0,5 volúmenes de fenol saturado en 0,2 M Tris. Se agitaron 5 minutos y se añadieron otros 0,5 volúmenes de cloroformo-alcohol isoamílico (25:1) con el fin de extraer los ácidos nucleicos de estas fracciones, tal como se ha descrito en Material y Métodos. Una vez extraídos los ácidos nucleicos se valoró la cantidad de DNA por el método fluorométrico del ácido diamino benzóico, el poli(A) por hibridación con poli(U) tritiado y el RNA por absorción óptica a 257 nm.

La Tabla XVI muestra el resultado de estos experimentos. El ácido poliadenílico se encuentra en las tres fracciones extraídas. La mayoría del poli(A) se encuentra en la fracción de mitocondrias y membranas, donde a su vez representa el 1,6 ‰ del RNA de esta fracción y en la fracción posmitocondrial, donde está el 36% del poli(A) y representa el 0,6 ‰ del RNA de esta fracción. La fracción de núcleos y plaquetas de vitelo contiene también una cantidad importante de poli(A) que representa el 26% del total.

La suma de las cantidades de ácido poliadenílico presentes en las tres fracciones indica la existencia de 2,3 μ g de poli(A) en 10^5 embriones enquistados de Artemia. Este poli(A) representa el 0,8 ‰ del total de RNA de los quistes.

TABLA XVI. DISTRIBUCION SUBCELULAR DE LOS ACIDOS NUCLEICOS
EN EMBRIONES ENQUISTADOS DE Artemia

Fracción	poli(A)		RNA		DNA	
	$\mu\text{g}/10^5$	%	$\text{mg}/10^5$	%	$\text{mg}/10^5$	%
Núcleos y plaquetas de vitelo	0,55	25	0,87	30	0,99	91
Mitocondrias y membranas	0,91	40	0,58	20	0,09	8
Postmitocondrial	0,82	36	1,45	50	0,006	0,5

La cantidad total del RNA y DNA presente en los embriones enquistados e hidratados pero que no han reiniciado todavía su desarrollo postgastrular coincide con la determinada por otros autores (Renart, 1975; Clegg, 1978), lo que indica una eficiente recuperación.

Como control de la contaminación de las fracciones celulares se determinaron la cantidad de DNA presente en las diferentes fracciones. Como se muestra en la Tabla XVI, el 91% del DNA se localiza en la fracción de núcleos y plaquetas de vitelo y solamente un 8% en la fracción de mitocondrias y membranas. Por otra parte, para estudiar la posible contaminación de las diferentes fracciones por plaquetas de vitelo, se realizó una electroforesis en geles y el 7% de poliacrilamida de alícuotas de las fracciones. El resultado de la electroforesis se muestra en la figura 31. Se observan muy pocas proteínas comunes a las diferentes fracciones y concretamente, las proteínas características de plaquetas, muy mayoritariamente en el embrión enquistado, sólo se pueden ver en cantidad importante en la fracción de núcleos y plaquetas. Estas proteínas plaquetarias corresponden a las subunidades de la fosfovitelina, que han sido descritas por Chaffoy y Kondo (1980). Como conclusión de los estudios de contaminación de fracciones, podemos decir que esta es mínima, probablemente menor del 10%.

Los resultados obtenidos sobre la distribución subcelular del ácido poliadenílico no han sido descritos previamente en quistes de Artemia. Sin embargo está de acuerdo con los datos publicados sobre la existencia de RNA poliadenilados en la fracción de membranas (Simons y col., 1978) y en la fracción postmitocondrial (Nilsson y Hultin, 1975; Amaldi y col., 1977; Slegers y Kondo, 1977).

Debe señalarse que el estudio del poli(A) presente en los embriones sirve también para conocer la distribución del RNA

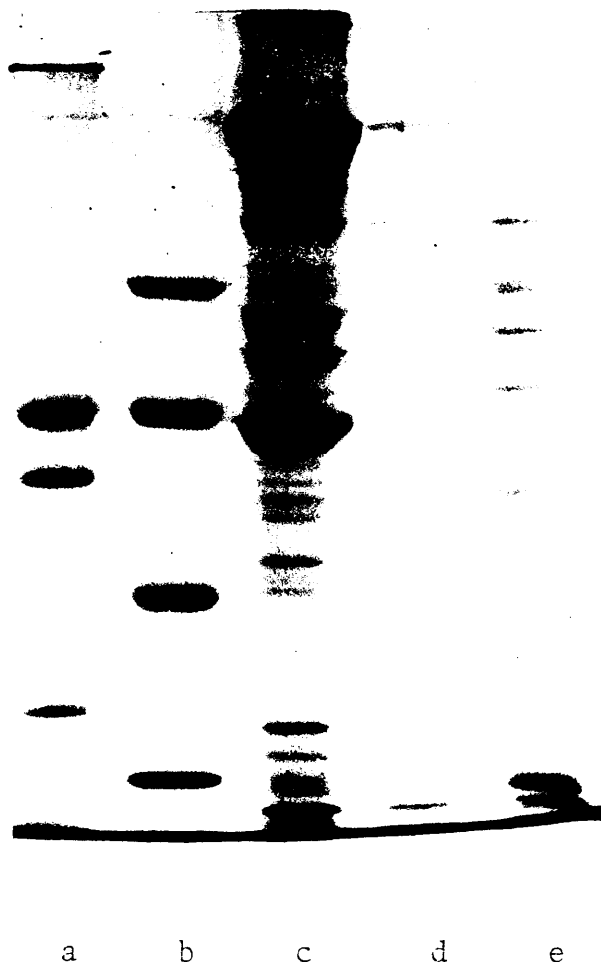


Figura 31. Electroforesis en gel de poliacrilamida de las fracciones subcelulares de embriones criptobióticos de Artemia

Embriones de *Artemia* fueron homogenizados y se separaron las diferentes fracciones subcelulares. Alicuotas de estas fracciones se sometieron a electroforesis en un gel en placa de poliacrilamida al 7%. Se obtuvieron tres fracciones celulares: núcleos + plaquetas de vitelo (muestra c), membranas + mitocondrias (muestra d) y posmitocondrial (muestra e). Se utilizaron proteínas marcadoras de pesos moleculares: 330000, 68000, 60000 y 36000 (muestra a) y de 94000, 68000, 43000 y 30000 (muestra b)

mensajero poliadenilado. De hecho, el poli(A) puede utilizarse como un marcador de este tipo de RNAs mensajeros.

La Tabla XVI muestra que casi el 25% del poli(A) se encuentra en la fracción de núcleos y plaquetas. Es evidente que el RNA poliadenilado presente en esta fracción tiene un notable interés. Sin embargo, las dificultades metodológicas para establecer una concreta identificación y caracterización del poli(A) y de los otros componentes bioquímicos asociados a este poli(A) en esta fracción han aconsejado el centrar los estudios posteriores en las otras dos fracciones que en su conjunto contienen el 75% del poli(A) presente en los quistes de Artemia.

2. Asociación del ácido poliadenílico con proteínas formando complejos ribonucleoprotéicos

Es conocido el hecho de que el RNA mensajero se encuentra en la célula asociada a proteínas formando complejos ribonucleoprotéicos. Existen diferentes métodos para demostrar la existencia de estos complejos. Uno de ellos es examinar la conducta del RNA en gradientes para establecer las correspondientes densidades de flotación.

Las fracciones subcelulares compuestas de mitocondrias y membranas y la fracción postmitocondrial se sometieron a una centrifugación isopícnica en gradientes de sacarosa. La fracción mitocondrial y de membranas se trató previamente con el detergente Tritón X-100 para separar los complejos ribonucleoprotéicos de las membranas con las que están asociados (ver más adelante).

El gradiente se formó con tres capas de sacarosa en tampón Tris-ClH 30 mM, pH 7,6, ClK 100 mM, Cl₂Mg 5 mM, cuyas concentraciones respectivas son 94%, 62% y 34% (proporción peso/volumen).

La muestra era de 3 ml de la correspondiente fracción subcelular.

Los gradientes se centrifugaron en el rotor SW-40 Ti a 35.000 rpm (150.000xg) durante 90 horas. Se recogieron fracciones de 0,4 ml. Cada fracción fué precipitada con 2 volúmenes de etanol. El precipitado fué resuspendido y el RNA extraído por fenolización, como se ha descrito en Materiales y Métodos. En cada fracción se determinó la cantidad de poli(A) por hibridación con poli(U) tritiado. La concentración de sacarosa de cada fracción se calculó por medición del índice de refracción a 20° C. En la figura 32 se muestra la distribución del ácido poliadenílico en los gradientes correspondientes a las fracciones postmitocondrial (panel superior) y la de mitocondrias y membranas (panel inferior). El poli(A) de la fracción postmitocondrial presenta una densidad de flotación en sacarosa de 1,29y el de la fracción de mitocondrias y membranas de 1,25. Estos datos demuestran que en ambas fracciones subcelulares el ácido poliadenílico se encuentra asociado con proteínas formando complejos de ribonucleoproteína. Las densidades de flotación obtenidas se corresponden con las partículas que contienen RNA mensajeros poliadenilados descritas por Slegers y Kondo (1977) y Simons y col. (1978).

Con objeto de estudiar la posible asociación de la poli(A) polimerasa con estas partículas se procedió a medir la actividad enzimática en las diferentes fracciones del gradiente isopícnico de la fracción postmitocondrial. El resultado de este experimento se muestra en la figura 33. Puede concluirse que la mayor parte de la actividad poli(A) polimerasa no está asociada con los complejos ribonucleoprotéicos que contiene el poli(A). Sin embargo, no puede excluirse que una parte minoritaria de la actividad puede estar unida a los mismos. El posible significado de esta actividad asociada se discutirá más adelante al tratar sobre los posibles mecanismos de activación de las

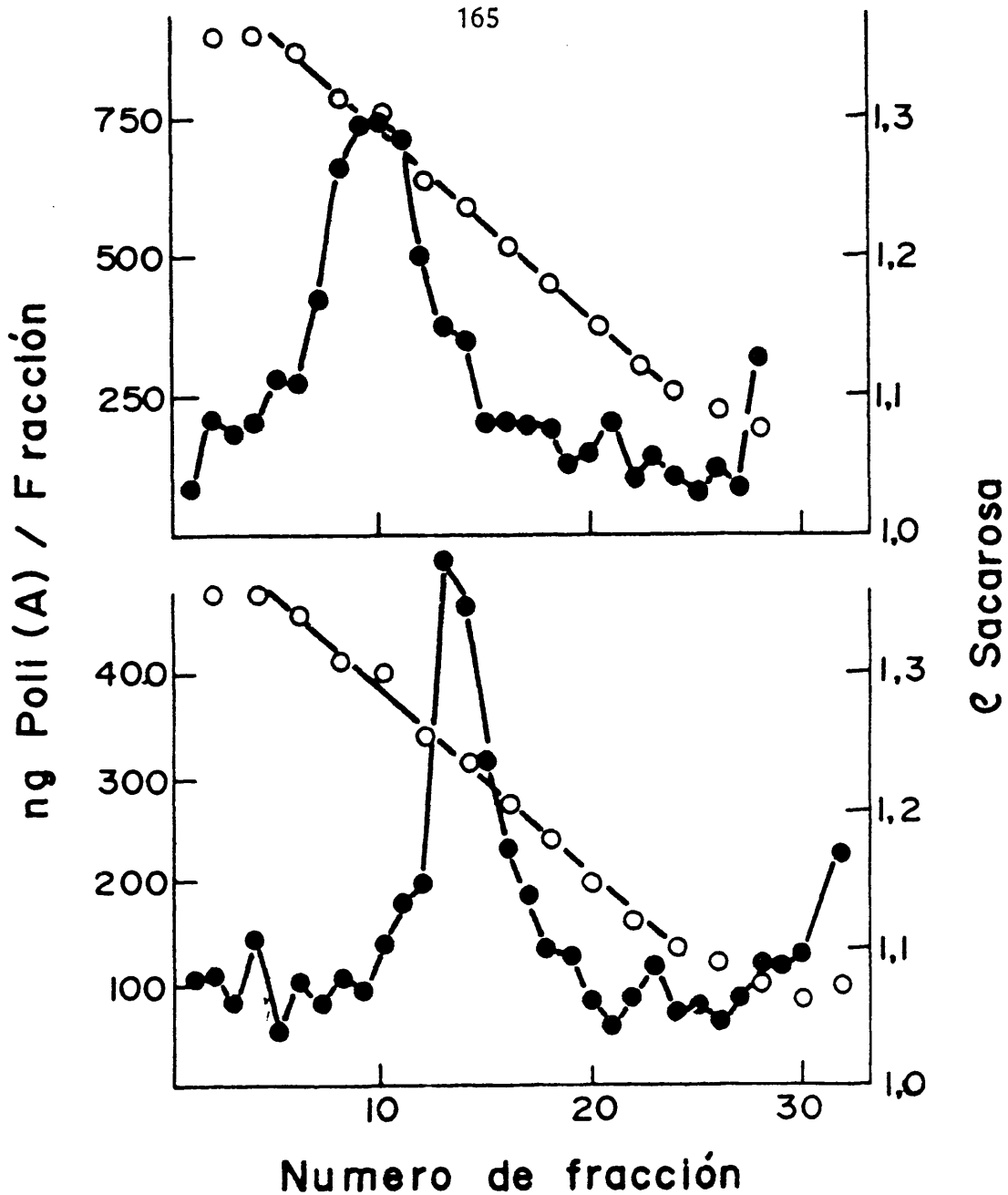


Figura 32. Determinación de la densidad de flotación en saca-
rosa de los componentes poliadenilados presentes
en las fracciones subcelulares de embriones enquis-
tados

Alícuotas de 3 ml de las fracciones postmitocondrial (panel superior) y de mitocondrias y membranas (panel inferior) fueron sometidas a centrifugación en gradientes isopícnicos de sacarosa. Los gradientes constaban de tres capas de sacarosa al 94, 62 y 34% (peso/volumen). Se centrifugaron en un rotor SW 40Ti a 35.000 rpm, 90 horas a 2°C. Se recogieron alícuotas de 0,4 ml. El RNA de cada fracción se extrajo por fenolización y la cantidad de poli(A) se determinó por hibridación con ^3H -poli(U) (●). Densidad del gradiente (○).

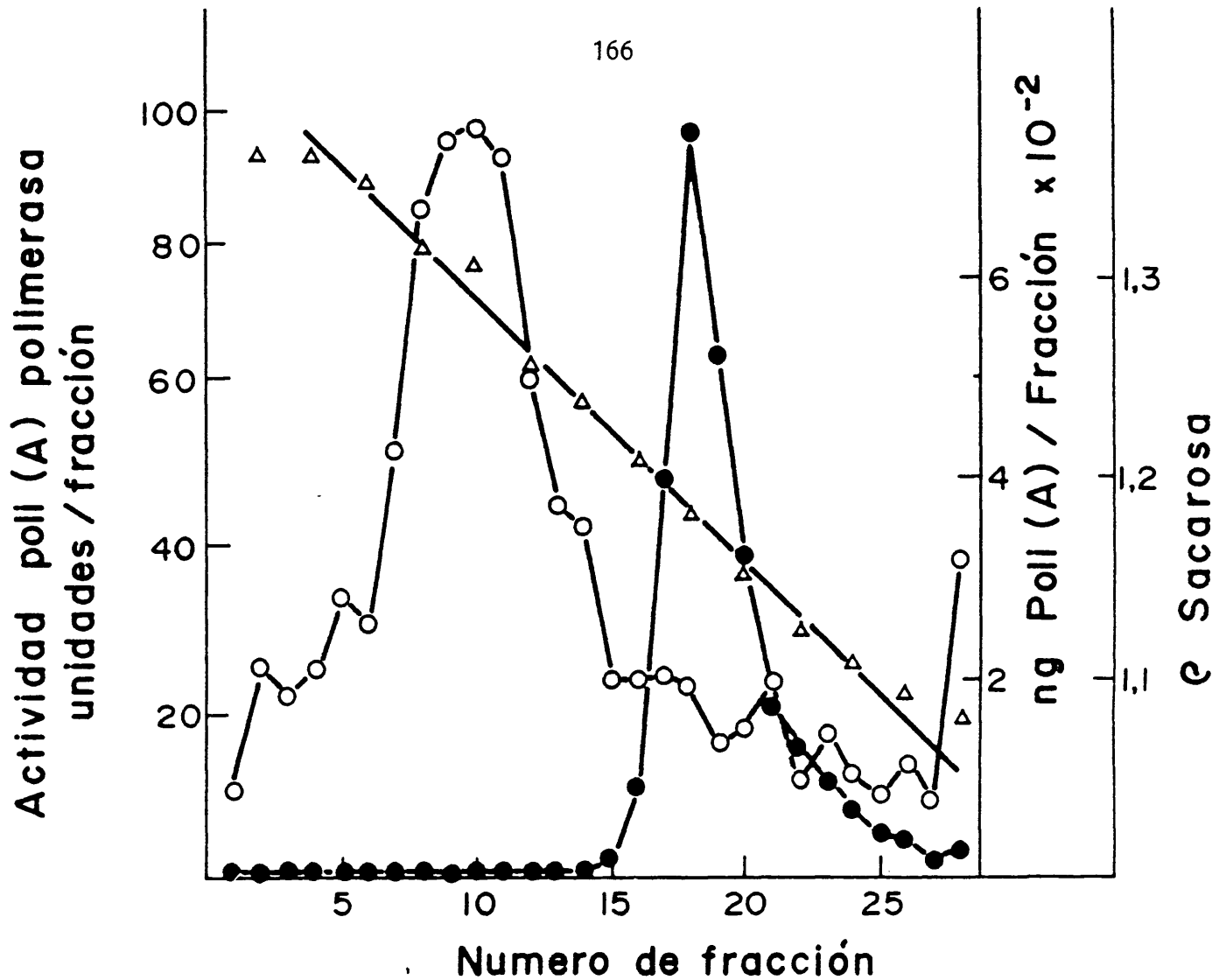


Figura 33. Distribución de la actividad poli(A) polimerasa en gradientes isopícnicos de sacarosa de la fracción postmitocondrial

Una alícuota de 3 ml de la fracción postmitocondrial de embriones enquistados se sometió a centrifugación isopícnica en gradientes de sacarosa. El gradiente constaba de tres capas de sacarosa al 94, 62 y 34% (peso/volumen) y se centrifugó en un rotor SW 40Ti a 35.000 rpm durante 90 horas a 2°C. Se recogieron alícuotas de 0,4 ml en las que se determinó la actividad poli(A) polimerasa (●) y la densidad de la fracción (Δ). El RNA de cada fracción se extrajo por fenolización, cuantificándose la cantidad de poli(A) por hibridación con ³H-poli(U) (○).

partículas que contienen los RNA mensajeros poliadenilados.

3. Variación en la cantidad de ácido poliadenílico y en su localización subcelular durante el desarrollo embrionario de Artemia

Una vez definidos algunos parámetros sobre el ácido poliadenílico presente en los embriones enquistados, se ha estudiado sus variaciones desde el momento de la activación de los embriones hasta la eclosión de las nauplias.

Se obtuvieron embriones en diferentes estadios de diferenciación y nauplias recién eclosionadas. Cada muestra fué homogenizada y se obtuvieron las correspondientes fracciones subcelulares. Las muestras de embriones anteriores a la eclosión se trataron con hipoclorito sódico al 5% previo a la homogenización.

Se exponen en primer lugar los datos correspondientes a la cantidad de ácido poliadenílico presente en el homogenado total de los embriones. La variación de la cantidad de poli(A) por cada 100.000 embriones se muestra en la Tabla XVII. Se observa que la cantidad de poli(A) pasa de $2,9 \mu\text{g}/10^5$ embriones en quistes a $11 \mu\text{g}/10^5$ embriones en nauplias, lo cual supone un incremento de casi cuatro veces. Este aumento no es un fenómeno asociado con la eclosión de las nauplias, puesto que se observa a todo lo largo de la embriogénesis postgastrular, siendo ya significativo a las pocas horas de la activación del desarrollo en los embriones. Por otra parte, este aumento de poli(A) es un aumento neto por célula, puesto que como ya hemos indicado anteriormente durante este período de desarrollo no existe aumento en el número de células. Estos datos globales no permiten conocer si el aumento en el poli(A) se manifiesta en todas las células del embrión o es exclusivo de algunos tipos de células que se diferencian durante la organogénesis. Si esto es así, el

TABLA XVII. VARIACION DEL CONTENIDO EN POLI(A) DURANTE EL
DESARROLLO EMBRIONARIO DE Artemia

<u>Horas de desarrollo</u>	<u>µg poli(A)/10⁵ embriones</u>
Embriones criptobióticos (To)	2,9
5 horas (T5)	4,7
11 horas (T11)	9,8
18 horas (T18, nauplias recién eclosionadas)	11,0

aumento del poli(A) en estas células podría ser muy superior a las cuatro veces que se han calculado como media para todo el organismo.

Un interesante problema que plantea este aumento en la cantidad de poli(A) durante el desarrollo de Artemia es si este aumento se debe a un aumento global de la cantidad de RNA mensajero poliadenilado, a un aumento de la longitud de la cadena del poli(A) preexistente o a ambos fenómenos.

En relación con el aumento en poli(A) durante el desarrollo de Artemia puede señalarse que en otros sistemas como el erizo de mar y la estrella de mar también se ha encontrado un aumento en la cantidad de poli(A), especialmente tras la fecundación y activación del proceso de desarrollo (Slater y Slater, 1974; Wilt, 1977; Jeffery, 1977).

La Tabla XVIII muestra la distribución del poli(A) en cada una de las fracciones subcelulares para embriones de distintas edades. En este caso la fracción postmitocondrial se sometió a una centrifugación de 105.000xg durante 2 horas con el fin de separar la fracción microsomal y el citosol.

El primer dato que interesa comentar es el aumento de la cantidad de poli(A) presente en la fracción microsomal, aumento que ya es patente a las 5 horas de desarrollo del quiste y que continua en etapas posteriores, hasta llegar a ser unas diez veces mayor en nauplias recién eclosionadas respecto al presente en los embriones en estado criptobiótico. Este aumento en la fracción microsomal puede reflejar la incorporación del RNA mensajero poliadenilado al proceso de síntesis proteica que se reanuda muy poco después de la activación del quiste (Amaldi y col. 1977).

TABLA XVIII. DISTRIBUCION SUBCELULAR DEL POLI(A) DURANTE
EL DESARROLLO EMBRIONARIO DE Artemia

<u>Fracción</u>	<u>$\mu\text{g poli(A)} / 10^5$ embriones</u>			
	<u>T0</u>	<u>T5</u>	<u>T11</u>	<u>T18</u>
Núcleos y plaquetas de vitelo	0,69	1,3	3,1	3,08
Mitocondrias y membranas	1,16	0,2	0,7	2,97
Microsomal	0,40	2,3	4,6	4,51
Citosol	0,64	0,8	1,4	0,44

El segundo dato es la disminución de la cantidad de ácido poliadenílico en la fracción de mitocondrias y membranas entre las 0 y las 5 horas. Esta disminución puede corresponder a la incorporación de RNA poliadenilado, que estaría almacenado en la fracción de mitocondrias y membranas de quistes a los polisomas. Se trataría en consecuencia de un proceso de movilización del RNA mensajero asociado a estas fracciones particuladas para su traducción. Estos datos sugieren que la síntesis de proteínas en las primeras horas tras la reiniciación del desarrollo se realizaría utilizando los RNA mensajeros acumulados en las partículas asociadas a las fracciones de membranas. El posterior aumento de la cantidad de ácido poliadenílico presente en esta fracción en nauplias puede corresponder a la fracción de polisomas asociados a membranas y que son responsables de la síntesis, entre otras, de proteínas de excreción.

Un tercer hecho es el aumento de más de 4 veces en la cantidad de ácido poliadenílico asociado a la fracción de núcleos y plaquetas. Este dato puede interpretarse como consecuencia del inicio de la síntesis de ácido poliadenílico en el núcleo, como consecuencia de la reanudación de la transcripción de nuevos RNA mensajeros y de su procesamiento. Este dato apoya, a su vez, a los datos presentados anteriormente acerca del aumento de la actividad poli(A) polimerasa en la fracción de núcleos y plaquetas entre las 0 y las 18 horas de desarrollo de los quistes.

Por último nos queda considerar la fracción citosólica. La cantidad de poli(A) aumenta ligeramente en esta fracción durante el desarrollo. Este dato iría en contra de la hipótesis, generalmente aceptada, de que el RNA poliadenilado presente en esta fracción en los quistes corresponde a formas de reserva, las cuales serían posteriormente movilizadas hacia la fracción polisomal en las primeras etapas de la reiniciación del desarrollo. Sin embargo, hay que tener en cuenta que los datos sobre el

poli(A) no nos dan información sobre la naturaleza de las secuencias de RNA a las que se encuentran asociadas. En consecuencia, la constancia en la cantidad de poli(A) no es incompatible con un continuo cambio en los tipos de RNA mensajeros, los cuales podrían movilizarse hacia la fracción microsomal para su traducción y ser sustituidos por otros RNAs transcritos de novo. De hecho, todas las células metabólicamente activas contienen un porcentaje de RNA poliadenilado en la fracción citosólica formando partículas ribonucleoprotéicas. Parte de estas partículas cumplen funciones de reserva y son posteriormente incorporadas a polisomas y otras partículas representan formas inactivas de mRNAs, cuyo significado biológico no se conoce enteramente. En el caso de Artemia, sería necesario realizar un estudio de las secuencias de RNA poliadenilado presentes en el citosol en diferentes estadios del desarrollo para conocer el grado de homología y, en consecuencia, de recambio y de movilización de estos mRNAs poliadenilados.

Los estudios realizados y descritos en este apartado permiten obtener información sobre el metabolismo del poli(A) y del RNA mensajero durante la embriogénesis de Artemia. Por una parte, el aumento neto del poli(A) puede correlacionarse con el aumento en actividad poli(A) polimerasa y permite plantear el interesante problema de la relación entre el incremento de poli(A) y la activación de los RNA mensajeros y de la síntesis de proteínas. Por otra parte, y utilizando el poli(A) como un parametro bioquímico del RNA mensajero, los datos obtenidos permiten obtener conclusiones sobre el metabolismo del RNA mensajero, tanto en cuanto a su transcripción (aumento del poli(A) nuclear) como a su movilización y participación en polisomas para su traducción. Volviendo al tema de la activación de los RNA mensajeros almacenados, es interesante constatar que no sólo en Artemia, sino también en otros sistemas biológicos se ha encontrado una cierta correlación entre la poliadenilación y la activación de la síntesis de proteínas. Estos datos permiten postular la hipótesis

de que la poliadenilación de los RNA almacenados mediante la elongación de sus cadenas de poli(A) preexistentes podría ser uno de los posibles mecanismos implicados en la activación de estos mRNAs, que se encuentran como se ha demostrado anteriormente asociados a proteínas formando complejos o partículas ribonucleoprotéicas. Una de las predicciones de la hipótesis enunciada es que las partículas ribonucleoproteicas conteniendo el RNA mensajero poliadenilado deberían ser sustrato de la poli(A) polimerasa. Por ello, nos propusimos abordar este problema mediante el estudio de la poliadenilación in vitro de los complejos. Previamente se realizaron unos estudios para la purificación así como la caracterización de estos complejos o partículas. Los resultados obtenidos se describen en el apartado siguiente.

D. PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LOS COMPLEJOS RIBO-
NUCLEPROTEICOS CON CONTIENEN ACIDO POLIADENILICO PRE-
SENTES EN EMBRIONES ENQUISTADOS DE Artemia

El primer paso en el estudio de los complejos ribonucleo-
proteicos (RNPs) fue su purificación a partir de embriones en-
quistados de Artemia. Slegers y col. (1977, 1979) han publicado
una caracterización parcial de los RNPs presentes en la fracción
postmitocondrial. Sin embargo, los complejos presentes en la
fracción de mitocondrias y membranas puestos de manifiesto por
Simons y col. (1978) no se han purificado previamente.

1. Solubilización de los complejos ribonucleoproteicos
asociados a la fracción subcelular compuesta por mito-
condrias y membranas

El primer problema en la purificación de los complejos ri-
bonucleoproteicos asociados a esta fracción es su solubiliza-
ción. Se realizaron varias pruebas con el objeto de lograr una
solubilización selectiva de estos complejos. La metodología em-
pleada consistió en resuspender la fracción de mitocondrias y
membranas en tampones de diversa composición, teniendo a conti-
nuación la suspensión a 4°C durante media hora. Al cabo de este
tiempo la suspensión se centrifugó a 15.000xg durante 15 minu-
tos extrayéndose el RNA del sobrenadante de esta centrifugación
y valorando en él el poli(A) por hibridación. Una alícuota de
la fracción estudiada fue fenolizada para extraer el RNA y medir
la cantidad de poli(A) por hibridación con poli(U) para poder
referir los datos de solubilización con las condiciones que se
describen.

Los resultados se muestran en la Tabla XIX, de la que se
deduce que los complejos sólo se solubilizan en su totalidad en

TABLA XIX. SOLUBILIZACION DEL POLI(A) DE LA FRACCION DE MITOCONDRIAS Y MEMBRANAS DE EMBRIONES ENQUISTADOS DE Artemia

<u>Tratamiento</u>	<u>% poli(A) solubilizado</u>
Tampón de homogenización	6
10 mM HEPES pH 7.5 + 1 mM EDTA	30
10 mM HEPES + 0,5 M ClNH ₄	22
10 mM HEPES + 0,5 M ClK	25
10 mM HEPES + 1% Tritón X-100	91
10 mM HEPES + 1% NP40	73

presencia de detergentes, tales como el Triton X-100 o el Nonidet-40. Se obtiene un grado de solubilización muy bajo (en comparación con el control con EDTA) en presencia de sales. Estos datos indican que la unión de los complejos a las estructuras membranosas es a través de contactos hidrofóbicos, es decir, que las partículas parecen tener parte de su estructura incluida en la parte lipídica de las membranas. La alternativa contraria sería que las partículas estuvieran unidas por enlaces iónicos a componentes proteicos en la membrana, pero ésta es poco compatible con los datos de que 0,5 M de ClK o ClNH₄ no solubilizan los complejos.

2. Purificación de los complejos ribonucleoproteicos presentes en las fracciones de mitocondrias y membranas y en la fracción postmitocondrial

La técnica de purificación de los complejos se basa en que se retienen, a través de su componente poliadenílico, en columnas de Oligo (dT)-celulosa en presencia de 0,15 M ClNa, eluyéndose de la columna cuando se pasa a través un tampón sin sal y a temperatura de aproximadamente 50°C.

Para mejorar la purificación hemos diseñado dos pasos previos a la cromatografía de afinidad. El primero se utiliza para la purificación de los complejos de la fracción membranosamente solubilizados con Tritón X-100. Este paso consiste en un tratamiento con Bio-Bed a una concentración de 0,33 gr/ml. Este paso tiene por objeto eliminar el Tritón X-100 de la preparación, al quedar el detergente retenido en el Bio-Bed. La presencia de Tritón en la preparación que se cromatografía a través de Oligo (dT)-celulosa disminuye el rendimiento en complejos ribonucleoproteicos y acorta la vida media de la columna, puesto que el Tritón X-100 queda en parte retenido en la misma. La utilización de Bio-Bed no disminuye el rendimiento, puesto que menos de un 10% del ácido poliadenílico se retiene en Bio-Bed.

La segunda modificación utilizada en la purificación de los complejos del sobrenadante postmitocondrial consiste en la incubación de la preparación de complejos con celulosa neutra en presencia de 0,15 M ClNa durante 30 minutos con agitación continua. Al cabo de los 30 minutos se centrifuga la suspensión a 15.000xg durante 15 minutos, recogiénndose el sobrenadante, en el que se encuentra más del 75% del ácido poliadenílico original. La razón de esta incubación reside en suprimir de la preparación de complejos componentes hidrofóbicos, en su mayoría lípidos, que interaccionan con la celulosa (y por lo tanto con la Oligo(dT)-celulosa), separándose en parte cuando se eluye con un tampón sin sal. Cuando se suprime este paso estos componentes constituyen un contaminante importante de los complejos ribonucleoprotéicos. En las preparaciones de membranas esta función parece ser desempeñada por el propio Bio-Bed, por lo que no se utiliza la incubación con celulosa neutra en el proceso de purificación.

A las fracciones subcelulares, una vez efectuados los tratamientos previos que se han descrito, se les añadió un tampón compuesto por Hepes 20 mM pH 7,6, ClNa 0,3 M y EDTA 10 mM en cantidad suficiente para que las concentraciones finales fueran ClNa 0,15 M y EDTA 5 mM (con el fin de secuestrar el catión magnesio que estaba presente a una concentración de 2,5 mM). En el caso de la fracción postmitocondrial la adición de este tampón fue previa a la incubación con celulosa. La presencia de magnesio parece activar un proceso ribonucleásico en la proximidad de la cola de poli(A) de los RNAs de los complejos (Slegers y col., 1979). La etapa siguiente consistió en la cromatografía de la preparación en una columna de Oligo(dT)-celulosa. Se utilizó una columna de 2 ml para cada fracción. El flujo de la muestra fué de 20 ml/hora. Una vez pasada la muestra se lavó cada columna con 15 ml de Tampón Hepes 10 mM pH 7,6, EDTA 5 mM,

ClNa 0,15 M, volumen que se ha comprobado es suficiente para eluir todo el material no unido a la resina de afinidad. Los complejos ribonucleoprotéicos se eluyeron mediante el paso de tampón Hepes 10 mM, pH 7,6, EDTA 1 mM a 50°C.

En la figura 34 se muestra el perfil de una columna de Oligo(dT)-celulosa. En este experimento se partió de 5 gr de quistes, obteniéndose 13 ml de fracción postmitocondrial, los cuales fueron diluidos con 13 ml de tampón Hepes 20 mM, pH 7,6, EDTA 10 mM, ClNa 0,3 M, incubados con celulosa y sometidos a cromatografía de afinidad a través de Oligo(dT)-celulosa. Se recogieron fracciones de 2,8 ml, las cuales fueron fenolizadas para obtener los ácidos nucleicos. En las correspondientes fases acuosas se valoró la cantidad de poli(A) por hibridación, y la cantidad de RNA por absorción óptica a 257 nm. La flecha indica la fracción en la cual se comenzó la adición del tampón sin sal. Como se puede ver, en presencia del tampón sin ClNa se eluye un componente sumamente enriquecido en poli(A) (la relación poli(A)/RNA aumenta 100 veces).

El rendimiento de la purificación de los complejos es de un 40% para la fracción postmitocondrial y un 45% para la de membranas y mitocondrias. Estos bajos rendimientos parecen corresponder a un problema de saturación de la columna, puesto que si las fracciones no retenidas se vuelven a pasar por la columna de Oligo(dT)-celulosa se obtiene una cantidad de poli(A) retenido casi igual que en el primer pase por la columna. Por esta razón las fracciones no retenidas en la columna eran sistemáticamente recromatografiadas, consiguiendo de este modo rendimientos de hasta el 80 ó 90% del ácido poliadenílico.

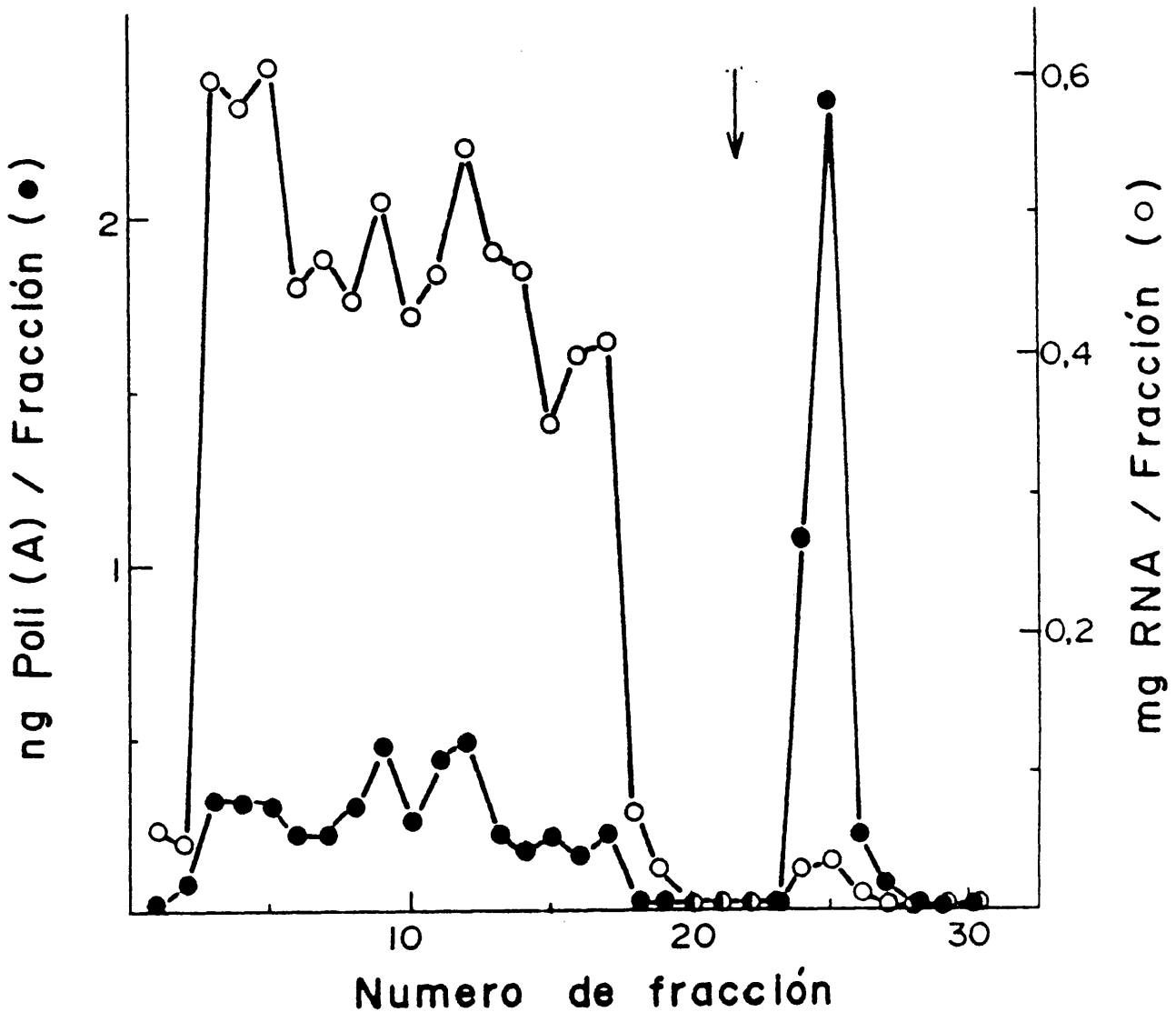


Figura 34. Cromatografía en oligo(dT)-celulosa del sobrenadante postmitocondrial de embriones enquistados

Una alícuota de 13 ml de la fracción postmitocondrial se cromatografió en una columna de 2 ml de oligo(dT)-celulosa. La columna fué lavada con 10 ml del tampón Hepes 10 mM, EDTA 5 mM, ClNa 0,15 M, pH 7,6 tras la aplicación de la muestra. La flecha indica el comienzo de la elución con el tampón Hepes 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,6 a 50°C. Se recogieron fracciones de 2,8 ml de las cuales se extrajo el RNA. El RNA presente en cada fracción se determinó por la absorción óptica a 260 nm (○) y el ácido poliadenílico por hibridación con ³H-poli(U) (●).

3. Caracterización de los complejos ribonucleoproteicos purificados

Una vez purificados los presuntos complejos ribonucleoproteicos, procedimos a su caracterización, con objeto en primer lugar de confirmar la naturaleza ribonucleoprotéica del componente purificado.

3.a. Determinación de la densidad de flotación en gradientes isopícnicos de sacarosa

La característica más importante de los complejos ribonucleoprotéicos es su densidad de flotación, pues es la única que permite asegurar que están compuestos por una asociación de proteínas y RNA. En consecuencia, esta fue la primera propiedad que se estudió en el material poliadenilado purificado. La composición de los gradientes es la misma que se describió en el apartado correspondiente a los gradientes isopícnicos de sacarosa de las fracciones subcelulares. Las muestras consistieron en 3 ml de las fracciones retenidas en las columnas de Oligo(dT)-celulosa y eluidas por un tampón sin ClNa a partir de las fracciones de mitocondrias y membranas y de la postmitocondrial. El gradiente se centrifugó a 35.000 rpm durante 90 horas en un rotor SW-40 Ti, recogiendo fracciones de 0,4 ml. Las fracciones se precipitaron con 2,5 volúmenes de etanol, procediéndose posteriormente a extraer el RNA presente en las mismas por fenolización, tal como se ha descrito en Materiales y Métodos.

El ácido poliadenílico presente en cada fracción se determinó por hibridación. En la figura 35 se muestran los resultados de estos gradientes, tanto para las partículas purificadas a partir del sobrenadante postmitocondrial (panel superior) como para las purificadas a partir de la fracción de mitocondrias y membranas (panel inferior). Las densidades de flotación deduci-

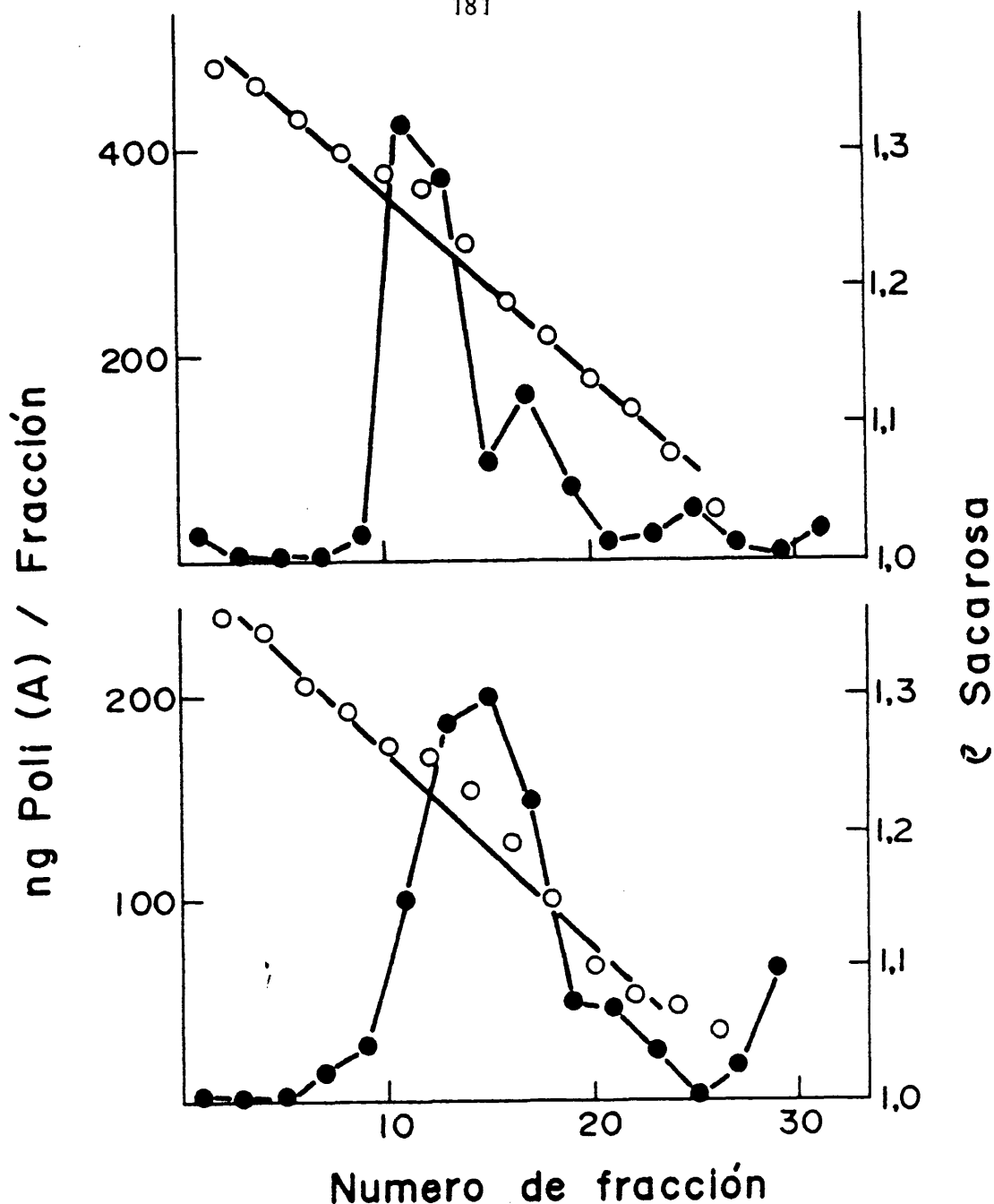


Figura 35. Gradientes isopícnicos de sacarosa de los complejos ribonucleoproteicos purificados

Los complejos ribonucleoproteicos purificados a partir de la fracción postmitocondrial (panel superior) y de la fracción de mitocondrias y membranas (panel inferior) fueron sometidos a centrifugación en gradientes isopícnicos de sacarosa. Los gradientes se formaron a partir de tres capas de sacarosa del 94, 62 y 34% (peso/volumen). Se centrifugaron en un rotor SW 40 Ti a 35.000 rpm durante 90 horas a 2°C. Se recogieron fracciones de 0,4 ml y se midió la densidad (○). El RNA de las fracciones fué extraído por fenolización, determinándose la cantidad de ácido poliadenílico por hibridación con ³H-poli(U) (●).

das a partir de estos gradientes fueron de 1,26 para los complejos de la fracción postmitocondrial y de 1,24 para los de la fracción de mitocondrias y membranas. Las densidades de flotación obtenidas nos permiten afirmar que el ácido poliadenílico retenido en la columna de Oligo(dT)-celulosa forma parte de complejos ribonucleoproteicos. Las densidades de flotación de los complejos purificados son, por otra parte, prácticamente idénticas a las de los complejos existentes en las fracciones antes del proceso de purificación, lo cual nos indica que los complejos purificados conservan su integridad.

3.b. Caracterización de los componentes proteicos de los complejos

Otra propiedad característica de los complejos ribonucleoproteicos es la población de componentes proteicos que forman parte de los mismos. Este estudio se ha realizado caracterizando los componentes proteicos en geles del 10% de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico, condiciones en que las proteínas migran según su peso molecular.

Para distinguir los componentes proteicos característicos de los complejos ribonucleoproteicos de otras proteínas que hubieran copurificado en la cromatografía en Oligo(dT)-celulosa, el estudio de componentes proteicos se ha realizado del siguiente modo: se sometieron los complejos ribonucleoproteicos purificados a centrifugación en gradiente, de forma que se separaron los complejos de las posibles proteínas contaminantes. El siguiente paso consistió en la electroforesis en geles de poliacrilamida de alícuotas de las diferentes fracciones obtenidas del gradiente. Otras alícuotas se utilizaron para determinar la distribución del poli(A) en el gradiente después de la correspondiente fenolización e hibridación cuantitativa con poli(U). El criterio adoptado para la identificación de los dife-

rentes polipéptidos como componentes intrínsecos de los complejos es el correlacionar la presencia de determinados polipéptidos en las fracciones del gradiente donde se localizan los complejos poliadenilados. Este es un criterio de tipo operacional y tiene una serie de limitaciones que no pueden infravalorarse. Por otra parte, está el problema de la naturaleza de la asociación de las proteínas en los complejos y de la posible existencia de estos polipéptidos tanto en forma asociada a los complejos como en forma libre.

La caracterización de las proteínas de los complejos se ha realizado tras la centrifugación de éstas en dos tipos de gradientes: gradientes isopícnicos de sacarosa y centrifugaciones zonales en gradientes de sacarosa del 5 al 20%. En la figura 36 se muestra el gel correspondiente a un gradiente isopícnico de los complejos ribonucleoproteicos purificados de la fracción postmitocondrial. La densidad de flotación característica de estos complejos corresponde a las fracciones 4 y 5 del gradiente.

En la figura 37 se muestran los geles correspondientes a centrifugaciones zonales de las partículas purificadas de las dos fracciones subcelulares. En estos gradientes ambos tipos de partículas presentan un coeficiente de sedimentación de aproximadamente 15 S, correspondiente a las fracciones 17-20 en ambos gradientes.

Para cada tipo de partículas se han considerado como proteínas componentes las que están presentes en todos los gradientes analizados (zonales e isopícnicos), considerando como componentes potenciales a los que están solamente en algunos de los gradientes.

Según este criterio, las proteínas componentes de los complejos presentes en la fracción postmitocondrial tendrían unos

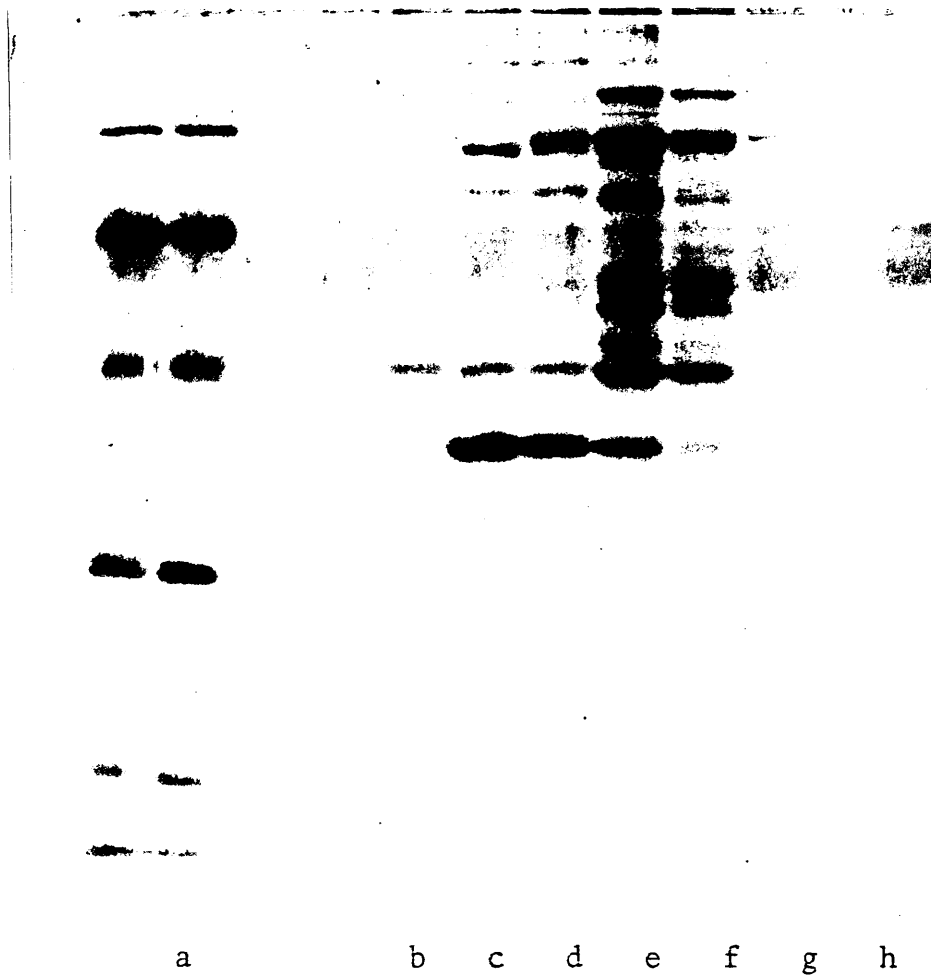


Figura 36. Electroforesis en gel de poliacrilamida de las fracciones de un gradiente isopícnico de sacarosa conteniendo complejos ribonucleoproteicos de la fracción posmitocondrial de embriones enquistados de Artemia.

Las partículas de ribonucleoproteína se sometieron a una centrifugación en gradientes isopícnicos de sacarosa en las condiciones descritas en la figura 35. Alicuotas de las fracciones se sometieron a electroforesis en gel en placa de poliacrilamida al 10%. Las muestras b-h corresponden a las fracciones 3-9 del gradiente, correspondiendo a la muestra c una densidad de 1,26. La muestra a contiene marcadores de pesos moleculares de 94000, 68000, 43000, 30000 y 20000.

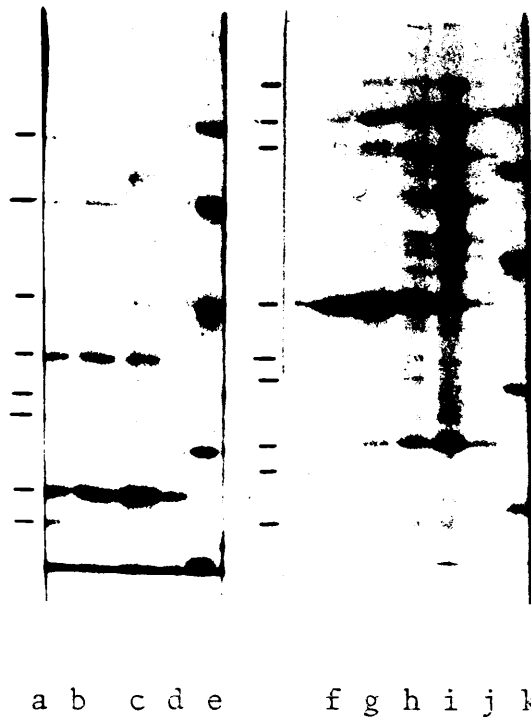


Figura 37. Electroforesis en geles de poliacrilamida de las fracciones de gradientes zonales conteniendo complejos ribonucleoproteicos de las fracciones de membranas + mitocondrias y posmitocondrial de embriones enquistados de Artemia.

Las partículas de ribonucleoproteína se sometieron a centrifugación en gradientes del 5-20% de sacarosa. Se recogieron fracciones de 1 ml y se reunieron cada tres fracciones. Alicuotas de estas fracciones se sometieron a electroforesis en geles en placa de poliacrilamida al 10%. Las muestras a-d corresponden a las fracciones 17-20, 21-24, 25-27 y 28-30 del gradiente de partículas de membranas. Las muestras f-j corresponden a las fracciones 13-15, 17-19, 21-23, 25-27 y 29-30 del gradiente de partículas de la fracción posmitocondrial. Las partículas migraron en las fracciones 17-23 de ambos gradientes. Las muestras e y k contienen marcadores de pesos moleculares 94000, 68000, 43000, 30000 y 20000.

pesos moleculares de: 110.000, 86.000, 77.000, 37.000, 30.000, 25.000, 23.500 y 20.500, pudiendo ser también componentes las proteínas de 130.000 y 42.000.

Los componentes de los complejos de la fracción de mitocondrias y membranas tienen pesos moleculares de: 90.000, 67.000, 45.000, 37.000, 34.000, 31.000, 23.500 y 22.000, pudiendo serlo también la proteína de peso molecular 77.000. En estos complejos son mayoritarias las proteínas de peso molecular 37.000 y 23.500. La Tabla XX resume los datos obtenidos. Es interesante destacar la existencia de tres polipéptidos en los complejos de las dos fracciones subcelulares que tienen pesos moléculas iguales. Se trata de los componentes de 37.000, 23.500 y 77.000, este último a reserva de confirmarse su presencia en los complejos de la fracción de membranas. Esta coincidencia de pesos moleculares no es sin embargo suficiente para identificar estos componentes como comunes para ambos tipos de partículas. Lo que sí parece evidente es la presencia de proteínas específicas para cada tipo de partículas. Asimismo, debe destacarse la presencia mayoritaria de la proteína de 37.000 en los complejos de la fracción postmitocondrial, proteína que también parece encontrarse en los complejos asociados a membranas. El análisis de las proteínas presentes en los complejos postmitocondriales realizado por Slegers y col. (1979) también señala que el componente de 37.000 es el mayoritario. Estos autores señalan que tanto la proteína de 37.000 como la de 76.000 están asociadas al fragmento de poli(A) de los complejos, puesto que se encuentran asociadas a este componente cuando los complejos se obtienen y se centrifugan en presencia de magnesio, que como se ha señalado anteriormente parece inducir la hidrólisis del poli(A) del resto de la molécula de RNA. Otras proteínas de pesos moleculares entre 45.000 y 68.000 descritas por Slegers no se aprecian en nuestras condiciones asociadas a las partículas, pero sí en la zona de los gradientes donde se encuentra una concentración baja de poli(A), por lo que pudieran no ser componentes intrínsecos

TABLA XX. PESOS MOLECULARES DE LAS PROTEINAS ASOCIADAS A LOS COMPLEJOS RIBONUCLEOPROTEICOS POLIADENILADOS DE EMBRIONES DE *Artemia*

<u>RNPs de la fracción postmitocondrial</u>	<u>RNPs de la fracción de membranas</u>
(130.000)	
110.000	
	90.000
86.000	
77.000	(77.000)
	67.000
	45.000
(42.000)	
37.000	37.000
	34.000
	31.000
30.000	
25.000	
23.500	23.500
	22.000
20.500	

de los complejos.

Otro dato que debe destacarse es la escasez de proteínas contaminadas que se encuentran en la fracción de los complejos purificados a partir de mitocondrias y membranas.

3.c. Tamaño del RNA poliadenilado asociado con los complejos ribonucleoproteicos

La caracterización del RNA poliadenilado de los complejos se ha realizado por electroforesis en geles de agarosa al 1,4%. Los complejos se purificaron como se ha señalado anteriormente y el RNA se extrajo mediante la correspondiente fenolización. La fase acuosa se precipitó con etanol y el RNA se recogió por centrifugación y se sometió a la electroforesis en las condiciones que se describen en Material y Métodos.

El resultado de la electroforesis se muestra en la figura 38. Como marcados se corrieron en paralelo los RNA ribosomales aislados de E. coli, los RNA ribosomales de Artemia y el RNA de transferencia de S. cerevisiae. Los datos calculados para los RNA de los complejos indican un coeficiente de sedimentación entre 7 y 10 S, tanto para los RNA de los complejos postmitocondriales como para los asociados a membranas. Estos coeficientes corresponden aproximadamente a unos pesos moleculares entre 80.000 y 120.000.

3.d. Estudio de la capacidad de traducción del RNA presente en los complejos ribonucleoproteicos

Se ha estudiado la capacidad de traducción del RNA extraído de las partículas ribonucleoproteicas, con objeto de demostrar la naturaleza de RNA mensajeros de este RNA. Para este estudio

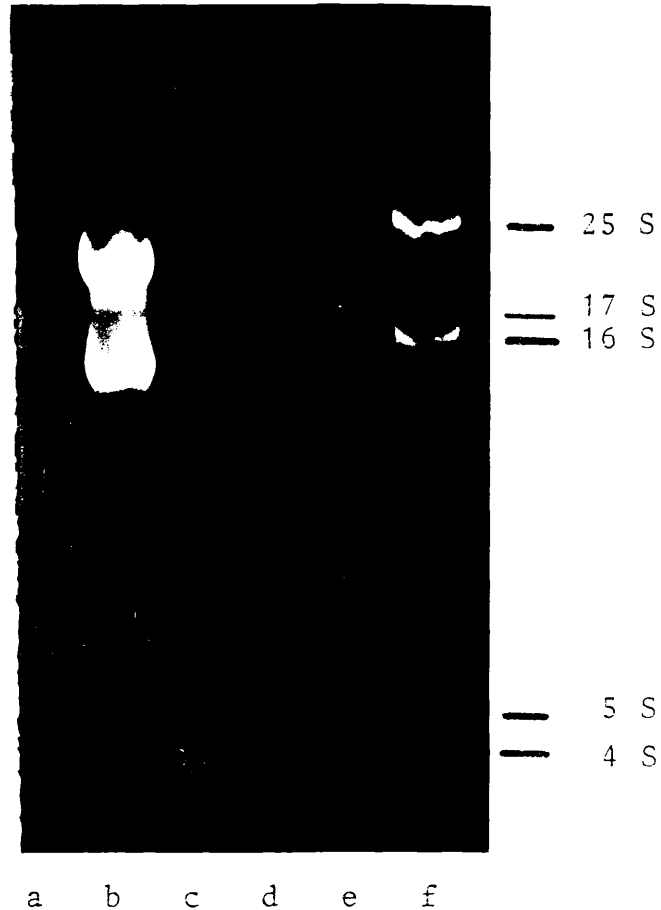


Figura 38. Electroforesis en gel de agarosa de los RNAs extraídos de los complejos ribonucleoprotéicos.

Se purificó el RNA presente en los complejos mediante extracción fenólica y las correspondientes alicuotas se sometieron a electroforesis en gel en placa de agarosa al 1,4%.

Muestra a: RNA de complejos de la fracción posmitocondrial.

Muestras b y f: rRNAs de Escherichia coli

Muestra c: tRNA de levadura

Muestra d: rRNA de Artemia calentado a 50°

Muestra e: RNA de complejos de la fracción de membranas.

se ha puesto a punto un sistema de traducción in vitro obtenido a partir de reticulocitos de conejos. Los procedimientos de obtención del sistema y el tratamiento de los lisados con nucleasas se realizó como ha sido descrito en el apartado Material y Métodos.

En una etapa preliminar se ha realizado un estudio para caracterizar la eficacia de traducción del mRNA presente en embriones enquistados y nauplias de Artemia. Los mRNAs de embriones enquistados y nauplias fueron purificados a partir del RNA existente en la fracción postnuclear en el caso de embriones enquistados y del presente en la fracción postmitocondrial en nauplias. En ambos casos el proceso de purificación consistió en una cromatografía de afinidad en columnas de poli(U) sepharosa. La columna contenía un volumen de 2 ml de poli(U) sepharosa. La muestra se resuspendió en un tampón compuesto por Hepes 10 mM, EDTA 1 mM, ClNa 0,5 M y SDS 0,5%, pH 7,5. Una vez aplicada la muestra se lavó la columna con 10 ml del tampón de muestra. El mRNA fue eluido con un tampón compuesto por Hepes 10 mM, EDTA 1 mM, SDS 0,5%, pH 7,5. La elución se realizó en primer lugar a 20°C, utilizándose 10 ml de tampón de elución a esta temperatura. Inmediatamente después se eluyó la columna con otros 10 ml de tampón de elución a 50°C. Se recogieron fracciones de 1 ml, midiéndose la absorción óptica a 260 nm. Se reunieron las fracciones con absorción a 260 nm, eluidas a 20 y 50°C y se ensayó su capacidad para estimular la síntesis de proteínas en el sistema de reticulocitos. Tanto el RNA eluido a 20°C como el eluido a 50°C se traduce en este sistema, si bien el RNA eluido a 50°C lo hace con mayor eficacia.

La figura 39 muestra la incorporación de ^{35}S -Metionina en proteínas en reacciones dirigidas por los mRNAs de embriones enquistados y nauplias. La incorporación es proporcional a la concentración de mRNA hasta concentraciones de 1 μg por ensayo de 30 μl . La incorporación es mayor cuando la síntesis es diri-

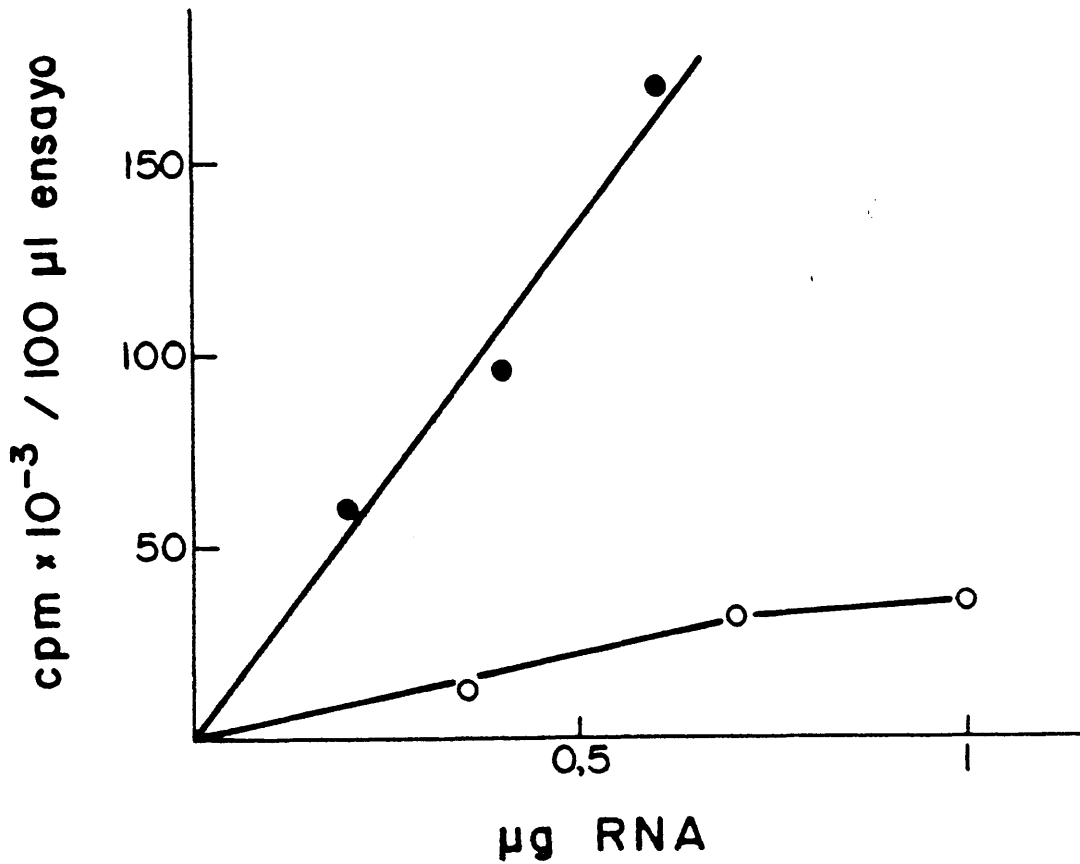


Figura 39. Traducción in vitro del mRNA de embriones enquistados y nauplias de Artemia

Diversas cantidades de mRNA de embriones enquistados (○) y nauplias (●) de Artemia fueron traducidas in vitro en un sistema de reticulocitos de conejo. Los mRNAs fueron purificados por cromatografía de afinidad en poli(U) sepharosa. Los ensayos de traducción in vitro se realizaron en las condiciones descritas en Material y Métodos. El tiempo de incubación fué de 60 minutos.

gida por el mRNA de nauplias. La incorporación dirigida por el mRNA de nauplias se puede cifrar en 275.000 CPM por μ gr de mRNA y 100 μ l de mezcla de ensayo en incubaciones de 60 minutos. La incorporación dirigida por el mRNA de embriones enquistados es de 37.000 CPM/ μ gr de mRNA/100 μ l de mezcla de ensayo en 60 minutos de incubación. La diferencia entre la capacidad de traducción de los mRNAs de estos dos estadios de desarrollo confirma los resultados de James y col. (1979).

La diferente capacidad de traducción podría deberse a que las condiciones óptimas de ensayo sean diferentes para los mRNAs de embriones enquistados y de nauplias. Para comprobar esta posibilidad se estudiaron las condiciones óptimas de ensayo de los mRNAs de embriones enquistados. En la figura 40 se representa la variación de la incorporación de 35 S-Metionina en proteínas según la concentración de ClK en reacciones dirigidas por el mRNA de nauplias y embriones enquistados. En ambos casos la actividad óptima corresponde a una concentración de ClK de aproximadamente 50 mM en el ensayo.

Se ha determinado la concentración óptima de Cl_2Mg en los ensayos de traducción con RNAs de embriones y nauplias. El óptimo se encuentra a una concentración de 0,3 mM para los dos tipos de RNA y es la misma que la que se ha encontrado para la traducción de los RNA mensajeros endógenos y para el RNA del virus TMV.

La relativamente baja eficacia de traducción de los mRNAs de embriones criptobióticos comparada con los mRNAs de nauplias se mantiene en ensayos donde se ha optimizado las concentraciones de Cl_2Mg y ClK.

Una vez conocida la capacidad de traducción del mRNA total de embriones enquistados se investigó la traducción de los RNAs purificados de partículas ribonucleoproteicas. La figura 41

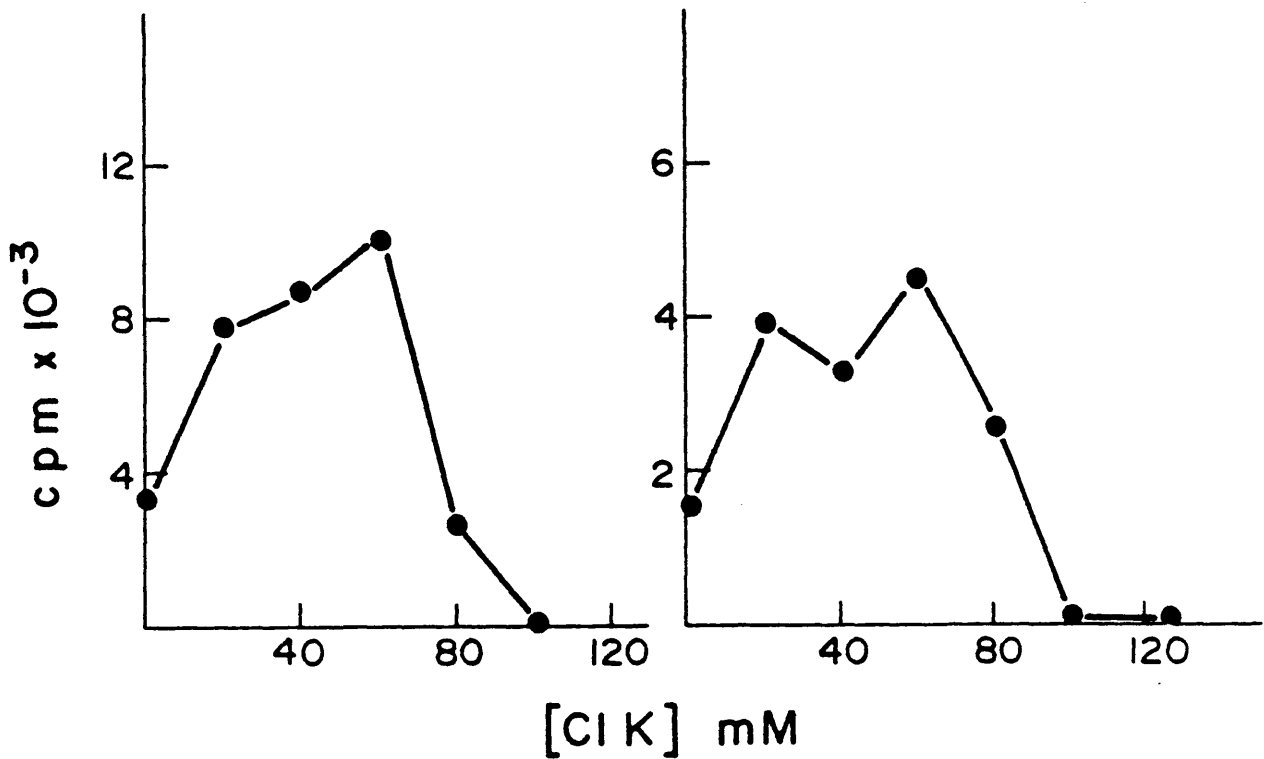


Figura 40. Efecto de la concentración de ClK en la traducción del mRNA de embriones enquistados y nauplias de Artemia

Alícuotas de 0,6 μ g de mRNA de nauplias (panel izquierdo) y 1 μ g de mRNA de embriones enquistados (panel derecho) fueron traducidos in vitro añadiendo diversas concentraciones de ClK. La reacción se incubó durante 60 minutos. En el ensayo con mRNA de nauplias se precipitaron alícuotas de 10 μ l. Cuando se utilizó mRNA de embriones enquistados se precipitaron 20 μ l de la mezcla de ensayo.

muestra la incorporación de ^{35}S - Metionina en reacciones dirigidas por los RNAs extraídos de complejos ribonucleoproteicos de membranas y del sobrenadante postmitocondrial. Ambos RNAs son capaces de dirigir la síntesis proteica. La capacidad de traducción se puede expresar como 14.000 CPM/ μg RNA/100 μl de mezcla de ensayo en 60 minutos para el RNA de partículas de membranas y de 40.000 CPM/ μg de RNA/100 μl de mezcla de ensayo en 60 minutos de reacción para el RNA de partículas del sobrenadante postmitocondrial. La capacidad de traducción del RNA de las partículas presentes en el sobrenadante postmitocondrial es similar a la del mRNA total de embriones enquistados. Por otra parte, la capacidad de traducción del RNA de partículas de membranas es 3 veces inferior a la del RNA de partículas del sobrenadante postmitocondrial, siendo más similar por su capacidad de traducción al RNA de embriones enquistados que eluye a 20°C de las columnas de poli(U) sepharosa, cuya eficacia de traducción es de 8.600 CPM/ μg de RNA/100 μl de mezcla de ensayo en 60 minutos de reacción.

Los resultados obtenidos estudiando la traducción in vitro del RNA de las partículas muestran que la capacidad de traducción de estos RNAs es comparable a la de los RNA mensajeros totales purificados a partir de los embriones criptobióticos. En consecuencia, estos datos muestran que las partículas contienen RNA mensajeros y que se purifican en un grado aceptable de integridad funcional. Estos datos confirman, por otra parte, los obtenidos con los mRNAs de embriones en cuanto a su menor capacidad de traducción en el sistema de reticulocitos de conejo en relación con los RNA poliadenilados obtenidos de nauplias.

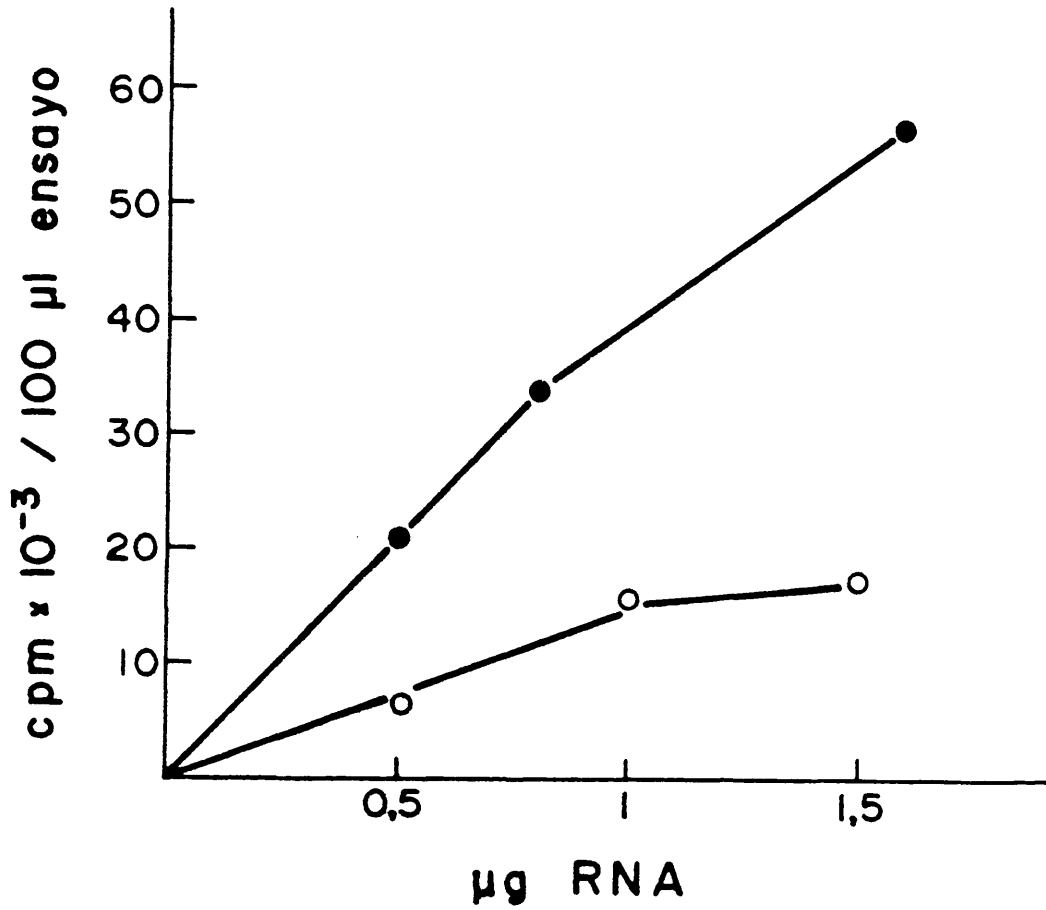


Figura 41. Traducción in vitro de los RNAs extraídos de partículas ribonucleoproteicas de embriones enquistados de Artemia

Se extrajeron por fenolización los RNAs de partículas ribonucleoproteicas purificadas. Diversas cantidades del RNA extraído a partir de las RNPs de la fracción postmitocondrial (●) o de RNPs de la fracción de mitocondrias y membranas (○) fueron traducidas in vitro. La reacción se incubó durante 60 minutos, al cabo de los cuales se precipitaron alícuotas de 20 μ l con ácido tricloroacético para determinar la incorporación de 35 S-Metionina en proteína.

E. POLIADENILACION IN VITRO DE LOS COMPLEJOS RIBONUCLEO- PROTEICOS DE EMBRIONES DE Artemia

El objetivo de la investigación que se describe en este apartado es conocer la capacidad de sustrato para la poli(A) polimerasa de los complejos ribonucleoprotéicos poliadenilados que se encuentran en los embriones criptobióticos de Artemia y cuya purificación y caracterización se ha descrito en el apartado anterior. El estudio de la capacidad de poliadenilación de estos complejos es importante puesto que de sus resultados puede obtenerse información sobre los mecanismos implicados en su activación y traducción.

1. Efecto de la concentración de complejos sobre la actividad poli(A) polimerasa

En los primeros estudios de poliadenilación in vitro de los complejos purificados a partir de las dos fracciones subcelulares señaladas anteriormente con la poli(A) polimerasa parcialmente purificada de quistes, observamos que existía una incorporación de adenosina tritiada a un producto insoluble en ácido tricloroacético. Esta incorporación es dependiente de la presencia de complejos en la mezcla de ensayo y la radioactividad incorporada es resistente en más de un 80% a incubaciones de 60 minutos con ribonucleasa pancreática a una concentración de 150 $\mu\text{g/ml}$, lo que demuestra la naturaleza poliadenílica del producto de reacción.

La figura 42 muestra que la incorporación de adenosina tritiada depende de la concentración de complejos presentes en el ensayo. El panel superior corresponde a las partículas de mitocondrias y membranas y el inferior a las de la fracción postmitocondrial. En ambos casos se observa una cinética hiperbólica.

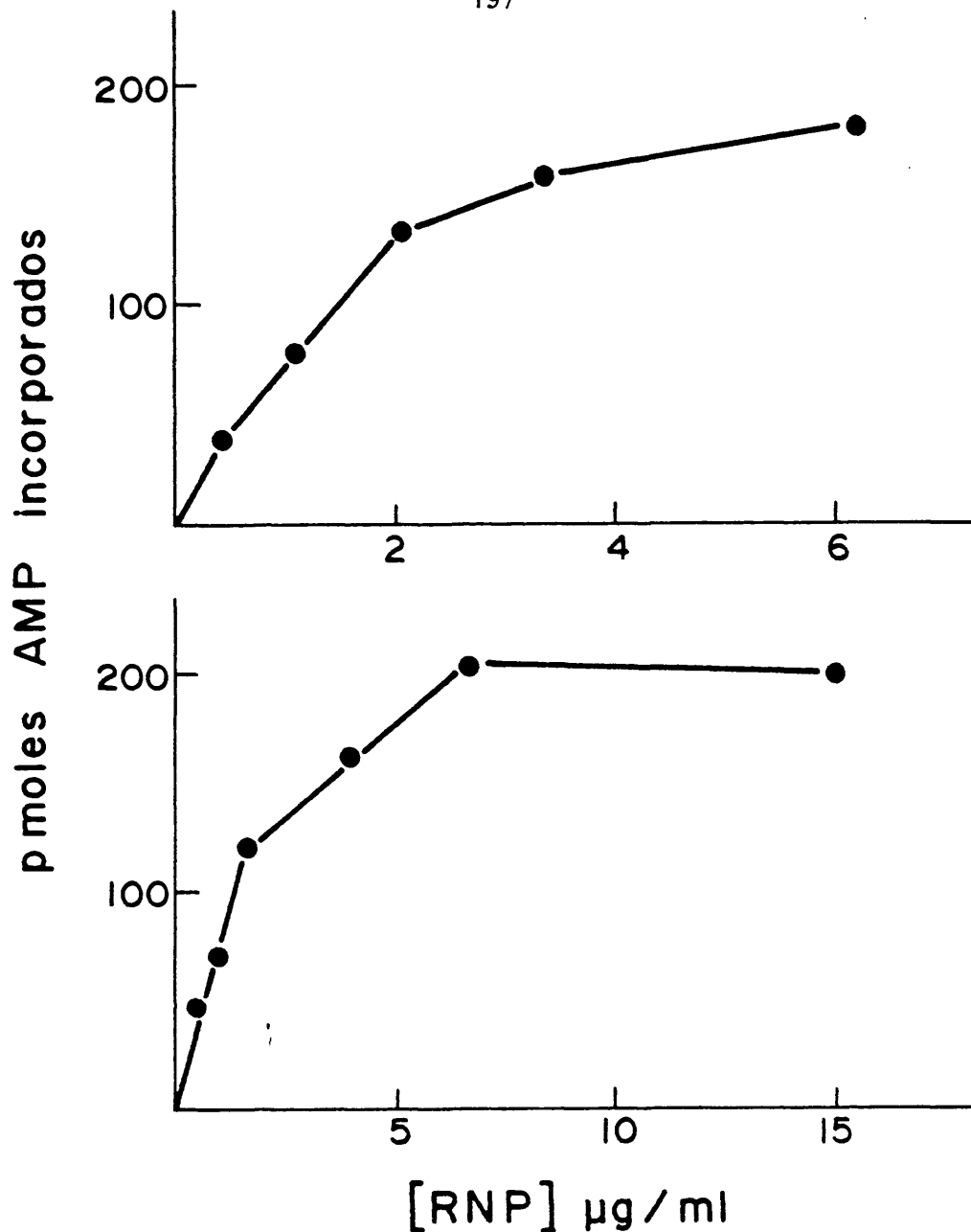


Figura 42. Dependencia de la actividad poli(A) polimerasa de la concentración de partículas ribonucleoproteicas

Se ensayó la actividad poli(A) polimerasa del enzima parcialmente purificado de embriones enquistados utilizando los complejos ribonucleoproteicos purificados como iniciadores. El ensayo se llevó a cabo en las condiciones descritas en Material y Métodos. Se utilizaron complejos purificados a partir de la fracción de mitocondrias y membranas (panel superior) y de la fracción postmitocondrial (panel inferior).

De estas gráficas se dedujeron unas constantes de Michaelis de 1,7 $\mu\text{g/ml}$ para las partículas postmitocondriales y de 1,4 $\mu\text{g/ml}$ para las de la fracción de mitocondrias y membranas. Estas concentraciones están calculadas a partir de los datos de absorción óptica a 257 nm y reflejan fundamentalmente la concentración correspondiente al RNA de las partículas. Suponiendo un peso molecular de aproximadamente 100.000 para este RNA (conforme con el coeficiente de sedimentación calculado), los valores de constante de Michaelis corresponderían a unas concentraciones de complejos de 17 nM y 14 nM, respectivamente.

Estos resultados muestran que las partículas ribonucleoprotéicas son sustrato para la poli(A) polimerasa y además que tienen una gran afinidad por el enzima. Las K_m calculadas para las partículas son de tres órdenes de magnitud menores que las K_m calculadas para otros sustratos en forma de RNA libre, como el RNA de Tórula, cuyo K_M es de 0,03 mM y el poli(A), cuyo K_m es de 0,01 mM. Estas diferencias pueden indicar que la poliadenilación de las partículas es un proceso que tiene un significado biológico en la célula.

Dada la gran afinidad de los complejos por la poli(A) polimerasa, se plantea el problema de saber si esta afinidad se debe a la naturaleza del RNA de los complejos o a una propiedad intrínseca del complejo de ribonucleoproteína. Para esclarecer este problema se ha estudiado la poliadenilación in vitro del RNA purificado de las partículas mediante su extracción con fenol-cloroformo. Los resultados obtenidos muestran que el RNA aislado también es sustrato de la poli(A) polimerasa.

La figura 43 muestra el efecto de la concentración de RNA sobre la actividad poliadenilante. El panel superior presenta los datos obtenidos con el RNA de complejos de mitocondrias y membranas, y el inferior con el RNA de los complejos postmitocondriales. La cantidad de enzima utilizada en este experimento

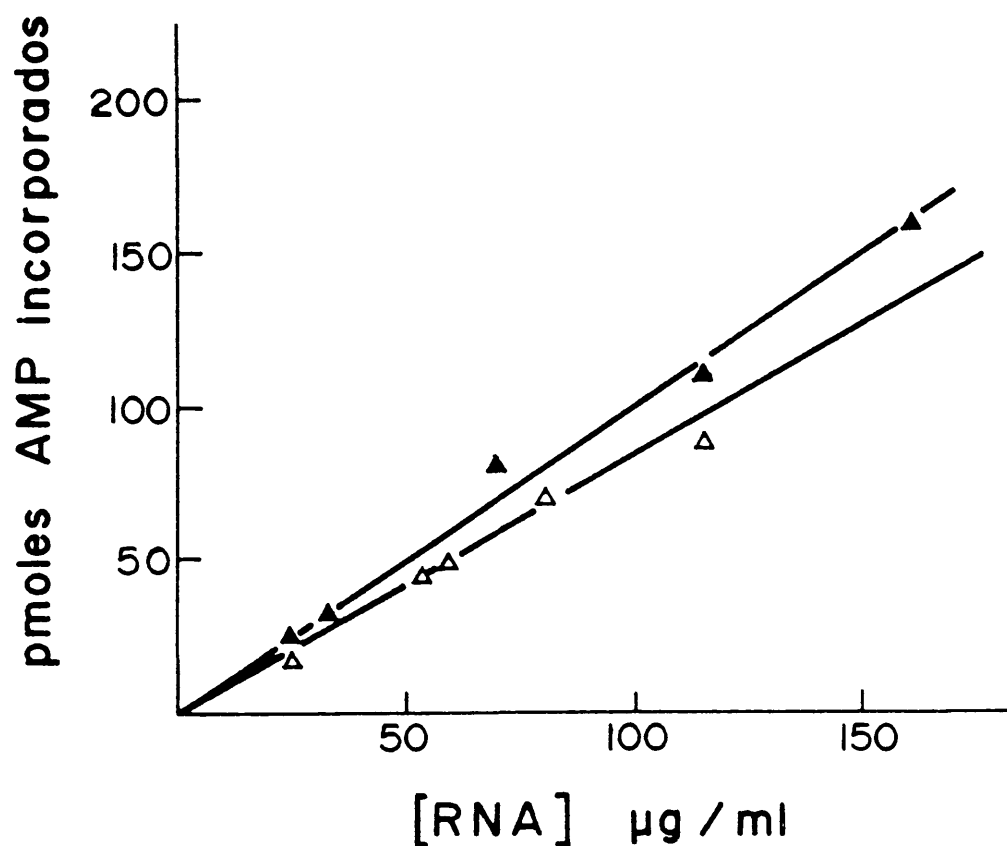


Figura 43. Dependencia de la actividad poli(A) polimerasa de la concentración de RNA extraído de las partículas ribonucleoproteicas

Se ensayó la actividad poli(A) polimerasa utilizando como iniciadores los RNAs obtenidos de las partículas ribonucleoproteicas purificadas de la fracción de mitocondrias y membranas (▲) y del sobrenadante postmitocondrial (△). Se utilizó el enzima parcialmente purificado de embriones enquistados. Las condiciones de ensayo fueron las descritas en Material y Métodos.

fue similar a la utilizada en el experimento descrito anteriormente con complejos ribonucleoprotéicos, por lo que los datos de actividad son directamente comparables. Los datos obtenidos no nos permiten un cálculo de la constante de Michaelis, dada la aparente lejanía de las concentraciones utilizadas con las de saturación del enzima (obtener concentraciones mayores es técnicamente difícil), pero son suficientes para demostrar que el RNA aislado de las partículas tiene una afinidad al menos dos órdenes de magnitud menor para la poli(A) polimerasa que las propias partículas. Los datos obtenidos permiten también conocer que la velocidad máxima de la reacción con RNAs purificados como sustrato es igual o mayor que la V_{max} con partículas como sustrato. Este hecho se encuentra también cuando se compara las partículas con otras clases de RNAs como las de Tórula o el poli(A).

En conclusión, la gran afinidad de las partículas por la poli(A) polimerasa constituye una propiedad intrínseca de su estructura nucleoprotéica, si bien esta estructura no afecta a la V_{max} del enzima. En la actualidad no conocemos qué propiedades de los complejos confieren su alta afinidad.

2. Efecto del tiempo de incubación sobre la actividad poli(A) polimerasa

En la figura 44 se representa la variación de la actividad poli(A) polimerasa con respecto al tiempo de incubación cuando se utilizan como iniciadores los complejos ribonucleoprotéicos (panel superior), o los RNAs purificados a partir de estos complejos (panel inferior). En ambos casos existe un período de latencia durante el cual la reacción enzimática es más lenta, aumentando su velocidad progresivamente con el tiempo de incubación hasta llegar a hacerse constante. Este fenómeno es el mismo que hemos descrito previamente para el enzima utilizando como iniciadores RNA de Tórula y poli(A). El período de laten-

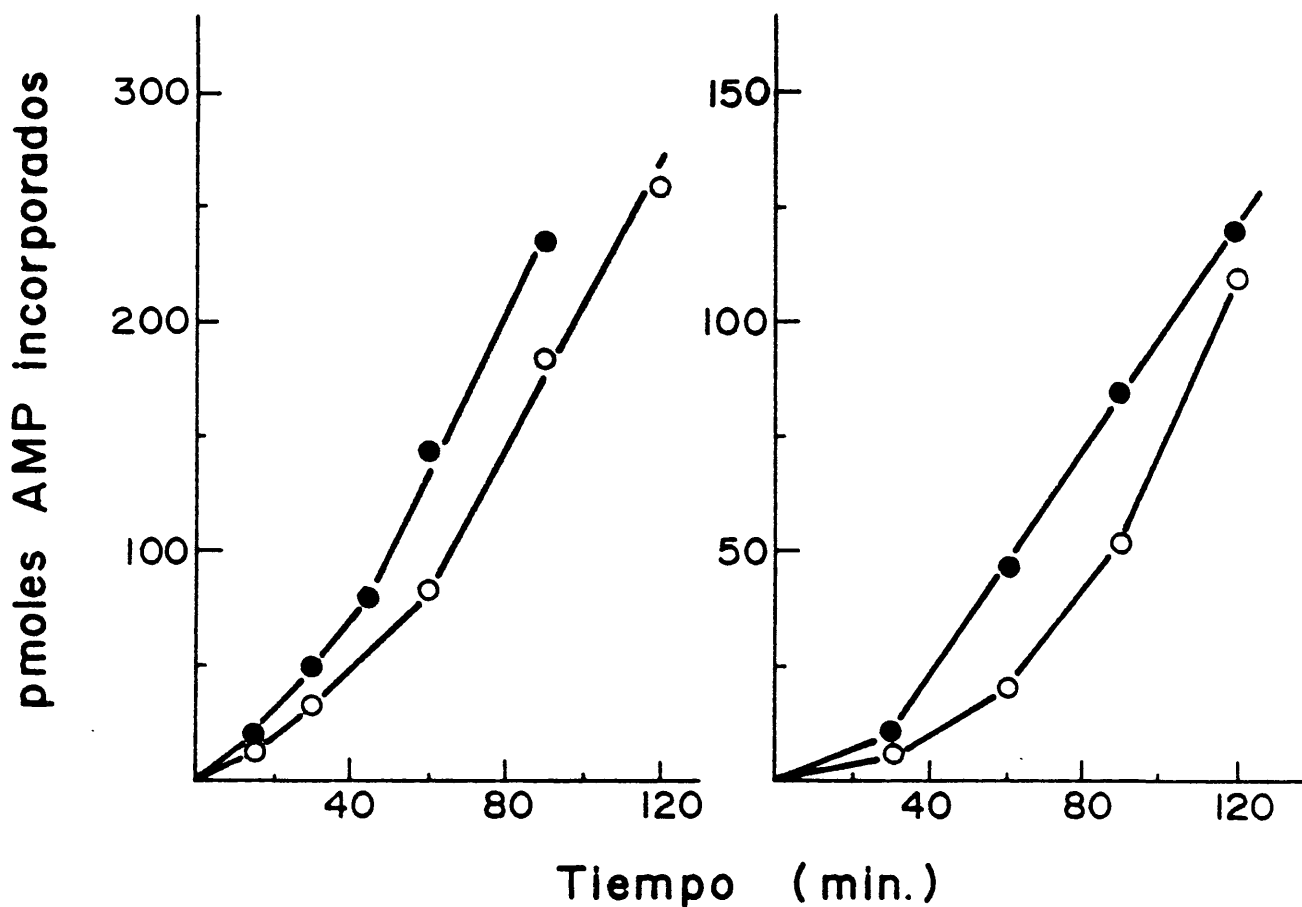


Figura 44. Dependencia del tiempo de ensayo de la poliadenilación de las partículas ribonucleoproteicas y del RNA extraído de las mismas

Se ha estudiado la variación de la actividad poli(A) polimerasa con el tiempo de ensayo utilizando como iniciadores las partículas ribonucleoproteicas (panel izquierdo) o los RNAs extraídos de estas partículas (panel derecho). En ambas gráficas se representan los datos obtenidos con partículas y RNA del sobrenadante postmitocondrial (●) y de la fracción de mitocondrias y membranas (○).

cia es mayor cuando se utilizan como iniciadores los RNAs que cuando se utilizan como iniciadores los complejos ribonucleoprotéicos.

Se ha investigado si el período de latencia depende de la concentración de iniciador presente en el ensayo. En la Tabla XXI se ha utilizado la relación de picomoles de adenosina triada incorporada en 90 minutos de incubación con respecto a los picomoles incorporados en 30 minutos como una forma de cuantificar el período de latencia. En dicha Tabla se muestra la dependencia de esta relación de actividades con la concentración del iniciador, tanto para complejos ribonucleoprotéicos como para los RNAs aislados de los mismos. En los dos casos los datos corresponden a complejos y RNA aislados de la fracción postmitocondrial. La relación de actividades es independiente de la concentración de iniciador, siendo en todos los casos de aproximadamente 5 para los complejos y de aproximadamente 10 para los RNAs.

Este dato demuestra que los datos de dependencia de la actividad poli(A) polimerasa con respecto a la concentración de iniciador son válidos para cualquier tiempo de incubación, no estando influidos por la existencia del período de latencia.

3. Longitud de la cadena poliadenílica sintetizada in vitro utilizando los complejos ribonucleoprotéicos como iniciadores para la poli(A) polimerasa

Para profundizar en el posible papel fisiológico de la poliadenilación de las partículas es interesante conocer el tamaño de la cadena poliadenílica añadida al RNA poliadenilado de estos complejos. Para ello se procedió al estudio de la longitud de la cadena poliadenílica sintetizada in vitro siguiendo el método descrito en Material y Métodos. Los resultados nos indican que

TABLA XXI. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE INICIADOR SOBRE EL PERIODO DE LATENCIA DE LA POLI(A) POLIMERASA

<u>Complejos RNP</u>	<u>Iniciador (μg)</u> <u>RNA purificado</u>	<u>Relación de actividad a</u> <u>90 min / 30 min</u>
2,0		4,8
4,0		4,9
6,0		4,1
8,0		4,6
11,8		5,4
	28,2	9,5
	56,4	10,4
	158,0	8,1
	186,0	10,6

la longitud de la cadena poliadenílica depende de la relación entre la cantidad de poli(A) polimerasa y la concentración de complejos presentes en el ensayo. Así por ejemplo, la longitud de la cadena de ácido poliadenílico añadida sobre los complejos aislados a partir de la fracción de mitocondrias y membranas es de 34 adenosinas cuando la relación de enzimas/partículas es de 5 unidades de actividad poli(A) polimerasa (definiendo la actividad utilizando RNA de Tórula como iniciador), por μg de complejos, de 70 cuando la relación es de 7 y de 133 cuando la relación entre el enzima y la cantidad de partículas es de 14. Para los complejos purificados a partir de la fracción postmitocondrial, la longitud de la cadena poliadenílica es de 50 bases cuando la relación entre la actividad enzimática y concentración de sustrato es de 3 unidades/ μg .

Es interesante señalar que la longitud de las cadenas de poli(A) presentes en el RNA de las partículas es de 45-65 bases (Nilsson y Hultin, 1975). En consecuencia, la poliadenilación in vitro supone al menos la duplicación de la cadena de poli(A). Estos datos permiten afirmar que la poliadenilación de las partículas puede realizarse in vivo generando cadenas de poli(A) de tamaños significativamente superiores a las cadenas de poli(A) preexistentes y en consecuencia introducir un cambio estructural en el RNA. La capacidad para ser poliadeniladas las partículas permite asimismo comprender los mecanismos de recambio por hidrólisis y síntesis de la cola de poli(A) de los RNA mensajeros que se han descrito en el citoplasma de las células eucarióticas.

IV. DISCUSSION

El primer objetivo planteado en el proyecto de estudio de la poliadenilación del RNA durante el desarrollo temprano de Artemia ha sido la caracterización del sistema enzimático implicado en el proceso.

Se ha encontrado la existencia de una actividad enzimática poli(A) polimerasa en embriones enquistados de Artemia. Esta actividad enzimática ha sido identificada como una poli(A) polimerasa en base a sus propiedades de especificidad de sustrato y a su capacidad para sintetizar una cadena de ácido poliadenilico unida a un RNA iniciador.

Los niveles de actividad poli(A) polimerasa presentes en embriones enquistados de Artemia son relativamente altos, siendo similares a los descritos para células infectadas por virus (Brakel y Kates, 1974) y superiores a los descritos en otras células eucarióticas, tales como timo de ternera (Winters y Edmonds, 1973 a y b), hígado de rata (Niessing, 1975) o levadura (Haff y Keller, 1975). Los niveles de actividad poli(A) polimerasa presentes en Artemia son similares a los existentes en otro sistema embrionario, los oocitos de erizo de mar (Slater y col., 1978). La actividad poli(A) polimerasa presente en fracciones solubles de oocitos de erizo de mar es de 4 U/mg de proteína, muy similar a la obtenida en fracciones solubles de embriones enquistados de Artemia (3,3 U/mg proteína). La existencia de una elevada actividad poli(A) polimerasa en estos dos sistemas en desarrollo podría estar relacionada con la existencia de una intensa poliadenilación durante el desarrollo embrionario.

La actividad poli(A) polimerasa caracterizada en embriones enquistados de Artemia está localizada en el citoplasma en un porcentaje superior al 80% de la actividad enzimática total del embrión. La localización citoplásmica de la mayor parte de la actividad poli(A) polimerasa es independiente del medio de homo-

genización utilizado.

Se ha descrito la existencia de actividades poli(A) polimerasa mitocondriales. El presente trabajo no nos permite descartar la posibilidad de que exista una actividad poli(A) polimerasa en las mitocondrias de Artemia.

La localización preferentemente citoplásmica del enzima en embriones enquistados de Artemia equiparan este sistema al de oocitos de erizo de mar, en el que el 99% de la actividad poli(A) polimerasa detectada es de localización citoplásmica.

Se ha abordado el problema de la purificación y caracterización de la actividad poli(A) polimerasa presente en los embriones enquistados de Artemia y que se obtiene en la fracción soluble de los homogenados. Los estudios realizados durante la purificación parcial de la actividad enzimática no ha permitido la identificación de más de una especie enzimática en los embriones enquistados. La actividad poli(A) polimerasa muestra un comportamiento homogéneo en las columnas de cromatografía ensayadas, tanto en las de intercambio iónico, tales como la DEAE-celulosa, Bio Rex 70, Hidroxiapatito y fosfocélulas, como en las columnas de afinidad (poli(A)-sepharosa, poli(U)-sepharosa, RNA-sepharosa, DNA-celulosa y ATP-agarosa). La actividad enzimática presenta también un comportamiento homogéneo en cuanto a su punto isoeléctrico y a su tamaño molecular estimado por gel filtración en Sephadex G-150, pH óptimo y estabilidad térmica.

Las características enzimáticas, tales como la especificidad de metal, sustrato e iniciador permanecen constantes a lo largo del proceso de purificación. Todos estos datos nos permiten proponer la existencia de una única especie de poli(A) polimerasa en la fracción soluble de embriones enquistados de Artemia.

La actividad poli(A) polimerasa de la fracción soluble de embriones enquistados de Artemia se ha purificado parcialmente. El esquema de purificación consta de cuatro pasos: cromatografía de intercambio iónico en columnas de DEAE-celulosa, cromatografía de intercambio iónico en columnas de Bio Rex 70, precipitación con sulfato amónico entre el 30 y el 45% de saturación y filtración en gel a través de columnas de Sephadex G-150. El proceso global permite una purificación del enzima de 100 veces, con un rendimiento del 36%, consiguiéndose una actividad específica final de 350 U/mg proteína.

La utilización de otras columnas de intercambio iónico, tales como el hidroxapatito o fosfocelulosa, así como la utilización de columnas de cromatografía de afinidad (poli(A)-sepharosa, poli(U)-sepharosa, DNA-celulosa, RNA-sepharosa, ATP-agarosa) no han permitido una mayor purificación del enzima al no retenerse en estas columnas en las condiciones ensayadas.

Las preparaciones enzimáticas parcialmente purificadas no presentan actividad ribonucleásica ni tampoco actividad adenosín trifosfatasa apreciable, por lo que han permitido abordar el estudio de caracterización del enzima, tanto desde un punto de vista de su especificidad como de sus propiedades cinéticas.

La filtración en columnas de Sephadex G-150 ha permitido estimar un peso molecular de 70.000 para la poli(A) polimerasa de embriones enquistados de Artemia. Este peso molecular es similar al estimado para otras poli(A) polimerasas citoplásmicas, tales como la de timo de ternera (Tsiapalis y col., 1975), embriones de ratón (Hadidi y Sethi, 1976) o células HeLa (Nevins y Joklik, 1977) que varían entre 62.000 y 75.000. Las diferencias de peso molecular son más marcadas con respecto a las poli(A) polimerasas nucleares, cuyos pesos moleculares oscilan entre 41.000 (isoenzima de hígado de rata) (Niessing y Sekeris, 1974), 100.000 (isoenzimas de levadura) (Haff y Keller, 1973) y

150.000 (timo de ternera) (Winters y Edmonds, 1973 a y b).

Se ha estimado un punto isoeléctrico de aproximadamente 6 para el enzima de embriones enquistados de Artemia.

Una vez identificada y parcialmente purificada la actividad poli(A) polimerasa de embriones enquistados se procedió a su caracterización. Se han estudiado los requerimientos del enzima, la reacción transcurre a un pH óptimo de 8,2. El enzima es termosensible, inactivándose en un 50% cuando se le incubaba a 45°C durante 5 minutos. La reacción enzimática requiere la presencia de un catión divalente en el medio de ensayo. La presencia de cationes monovalentes no es un requisito de la reacción, la velocidad de la reacción disminuye a medida que se aumenta la fuerza iónica del medio de ensayo y la actividad es de un 50% en presencia de ClK 80 mM con respecto a la actividad existente en ausencia de ClK cuando se utiliza RNA de Tórula como iniciador.

El catión divalente con el que se obtiene una velocidad de reacción máxima es el manganeso. Existe igualmente actividad en presencia de magnesio y de cobalto, siendo la actividad en estos casos menor del 10% de la actividad existente en presencia de manganeso. El enzima no presenta actividad en presencia de otros cationes divalentes ensayados. Las características del enzima en cuanto a sus requerimientos de cationes la hacen similar a otras poli(A) polimerasas solubles, tales como la descrita por Hadidi y Sethi (1976), Nevins y Joklik (1977) y Avramova y col. (1980). Los enzimas nucleares presentan en general una actividad similar o mayor con magnesio que con manganeso (Winters y Edmonds, 1973 a; Nevins y Joklik, 1977).

El enzima presenta gran especificidad para el nucleótido sustrato de la reacción. Existe actividad enzimática en presencia de dos nucleótidos, el ATP y el dATP. En las preparaciones parcialmente purificadas no existe actividad enzimática capaz de

polimerizar otros ribonucleósidos trifosfato, tales como el CTP, GTP, UTP, o ITP. Tampoco se polimerizan el ADP ni otros deoxirribonucleósidos diferentes del dATP, tal como el dGTP. La gran especificidad para nucleótidos de adenosina demuestra que en la preparación parcialmente purificada del enzima no existen actividades detectables de ribohomopolímero polimerasas ni de RNA-nucleotidil terminal transferasas.

La actividad enzimática responsable de la polimerización del ATP y del dATP podría corresponder a un solo enzima o a dos enzimas diferentes. La purificación incompleta del enzima permite plantearse estas dos alternativas. La incorporación de dATP se podría deber a una actividad DNA polimerasa o a una actividad deoxinucleotidil terminal transferasa. Sin embargo, los estudios de caracterización de la actividad enzimática responsable de la incorporación de dATP son todos ellos compatibles con la hipótesis de que la incorporación de dATP se debe a la poli (A) polimerasa. Los datos obtenidos pueden resumirse en tres tipos de resultados:

a) La preparación parcialmente purificada no presenta actividad enzimática capaz de polimerizar dGTP. Este dato permite afirmar que en las preparaciones parcialmente purificadas de enzima no existe actividad DNA polimerasa (Kornberg, 1980).

b) La relación entre la capacidad de polimerizar ATP y dATP permanece constante a lo largo de todo el proceso de purificación. Este dato indica que si ambas actividades se debieran a dos enzimas diferentes, estos tendrían que copurificar a lo largo de cuatro pasos de purificación, fenómeno que es relativamente improbable.

c) Existe una inhibición competitiva cruzada entre los sustratos. El ATP inhibe competitivamente la incorporación de dATP. Inversamente, el dATP inhibe competitivamente la incorpo-

ración de ATP. Estos resultados indican que los enzimas responsables de ambas polimerizaciones tienen las mismas propiedades de especificidad para el ATP y el dATP.

Por otra parte, la posibilidad de que la incorporación de dATP se deba a la existencia de una actividad deoxinucleotidil terminal transferasa puede descartarse debido a que la incorporación de dATP es dependiente de la presencia de un RNA iniciador, siendo así que las cadenas de RNA no son utilizadas por las deoxinucleotidil terminal transferasas como iniciadores (Bollum, 1978).

Los datos presentados permiten afirmar que la incorporación de dATP no es debida a la existencia de actividades DNA polimerasas ni deoxinucleotidil terminal transferasas. Los datos de copurificación y la similitud en la especificidad responsables de la polimerización de ATP y dATP permiten concluir que ambas se deban a un único enzima.

Se ha abordado igualmente el estudio de la especificidad de iniciador de la poli(A) polimerasa. Este enzima es capaz de utilizar como iniciadores moléculas de RNA monocatenario, no utilizando moléculas de RNA bicatenario ni de DNA, mono o bicatenario. El enzima presenta actividad máxima cuando utiliza como iniciadores RNAs heterogéneos (RNA ribosomal, RNA de Tórula), ácido poliadenílico o poli(AG), y muy poca actividad con otros ribohomopolímeros: poli(C), poli(G) y poli(U). La falta de actividad con estos ribohomopolímeros no se debe a un fenómeno de especificidad del enzima para la base del nucleótido 3' terminal del iniciador, puesto que se ha podido demostrar que el enzima utiliza como iniciador ácidos ribonucléicos con las cuatro posibles bases en su nucleótido 3' terminal. La falta de actividad podría corresponder con la formación de estructuras secundarias por parte de estos ribohomopolímeros.

Por sus características de especificidad de iniciador el enzima podría actuar tanto en procesos de iniciación de cadenas poliadenílicas como en procesos de elongación de cadenas pre-existentes, siendo el enzima de embriones enquistados de Artemia más similar a los enzimas citoplásmicos de células eucarióticas que a los enzimas nucleares (Winters y Edmonds, 1973 a y b; Tsiapalis y col., 1975).

Durante los estudios de caracterización del enzima se han podido observar una serie de peculiaridades cinéticas de la actividad enzimática. Algunas de estas propiedades no han podido ser explicadas totalmente a partir de los resultados experimentales obtenidos. Una de ellas es la existencia de un aumento en la actividad enzimática que no es proporcional a la cantidad de enzima presente en el ensayo. Este aumento de actividad no depende de la concentración total de proteína presente en el medio de incubación.

Otra peculiaridad del enzima es la existencia de un período inicial de incubación durante el cual la velocidad de reacción es muy baja, aumentando posteriormente. Este período inicial de latencia no se puede sustituir por una incubación previa del enzima en el medio de ensayo en ausencia de alguno de los sustratos.

Estos dos fenómenos han sido descritos previamente para otras poli(A) polimerasas tales como la de célula de tumor ascítico (Giron y Huppert, 1972), timo de ternera (Winters y Edmonds, 1973 a), hígado de rata (Niessing, 1975), hepatomas (Rose y col., 1975; Rose y Jacobs, 1976) y embriones de erizo de mar (Slaters y col., 1978).

En ninguno de los casos en los que se han descrito estos fenómenos se ha encontrado una explicación satisfactoria de los mismos. Una posible explicación ha surgido de los trabajos de

Rose y Jacob (1979 a) en los que se demuestra que existe una activación de la poli(A) polimerasa de hígados de rata y hepatomas mediada por un proceso de fosforilación. La existencia de actividades protein kinasas en preparaciones de poli(A) polimerasa podría originar una fosforilación del enzima en el transcurso de la reacción in vitro que produciría una activación del enzima en el transcurso de la reacción. De esta forma se podría explicar la existencia del período de latencia en la reacción. El mismo fenómeno podría explicar la relación entre la cantidad de enzima y la velocidad de reacción; al aumentar la cantidad de proteína añadida en el ensayo aumentaría también la cantidad de protein kinasa, pudiendo lograrse la fosforilación de una mayor proporción de moléculas del enzima poli(A) polimerasa.

Esta hipótesis no explicaría por qué el período de latencia depende de la naturaleza del RNA iniciador, siendo mayor con poli(A) que con RNA de Tórula. Para explicar este fenómeno mediante esta hipótesis sería necesario suponer que la capacidad de fosforilación de la poli(A) polimerasa depende de la naturaleza del RNA iniciador presente en el ensayo.

Otra característica cinética observada en estos ensayos es la existencia de una inhibición por exceso del sustrato ATP. Este fenómeno ha sido descrito para las poli(A) polimerasas de hígado de rata (Rose y Jacob, 1976; Koch y Niessing, 1978). La inhibición se ha caracterizado por estudios cinéticos como una inhibición no competitiva o anticompetitiva sin presentar efectos cooperativos. La constante de Michaelis aparente para el ATP como sustrato es 40 μ M, mientras que la constante de inhibición aparente es de 1 mM cuando se utiliza RNA de Tórula como iniciador. La diferencia entre ambas constantes para el ATP hace que la concentración óptima de ATP sea de aproximadamente 0,15 mM, concentración a la que la velocidad de reacción es el 70% de la velocidad máxima calculada para el enzima a partir de los parámetros cinéticos.

La inhibición por exceso de sustrato no se observa cuando se utiliza dATP. Este dato permitió establecer la hipótesis de que el ATP interaccionaba con dos sitios diferentes del enzima, uno de ellos sería el centro activo, con afinidad para ATP y dATP, y el otro sitio tendría afinidad exclusivamente para el ATP. La unión de una molécula de ATP al segundo de los sitios postulados produciría la inhibición de la actividad enzimática.

La constante de inhibición para el ATP depende del RNA iniciador utilizado en la reacción. Por otra parte, la inhibición por exceso de ATP se puede revertir aumentando la concentración del RNA iniciador. Estos dos datos nos han permitido postular que el segundo sitio de interacción del ATP responsable de la inhibición del enzima es el sitio de unión del iniciador.

Según esta hipótesis, la segunda molécula de ATP actuaría como análogo estructural del iniciador. Esta hipótesis explicaría la falta de inhibición por el dATP, puesto que el DNA no puede ser utilizado por el enzima como iniciador. Esta hipótesis se apoya también en el hecho de que la constante de inhibición para el ATP es de 1 mM cuando se utiliza RNA de Tórula como iniciador y de 2 mM cuando se utiliza poli(A), puesto que las constantes de Michaelis aparentes para ambos iniciadores son respectivamente de 0,03 mM y 0,01 mM. Existiendo, en consecuencia, una buena correlación entre la afinidad del enzima para los RNAs iniciadores y su capacidad para revertir la inhibición por ATP.

La poli(A) polimerasa de embriones enquistados de Artemia sintetiza una cadena de ácido poliadenílico unida al RNA iniciador. La unión de la cadena poliadenílica al RNA iniciador se ha demostrado por dos métodos diferentes: la asociación del producto de reacción al RNA iniciador en su migración en centrifugaciones zonales en gradientes de sacarosa y la transferencia del fosfato en posición α del ATP sustrato de la reacción al

nucleótido en posición 3' terminal del RNA iniciador. Este segundo experimento demuestra la unión covalente de la cadena poliadenílica sintetizada por el enzima al extremo 3' del RNA iniciador.

La naturaleza poliadenílica del producto de reacción se demostró por su resistencia a la degradación por las ribonucleasas pancreáticas y T1 y por su retención en columnas de poli(U)-sepharosa (Sastre, 1977).

Se han estudiado las características del producto de reacción. La longitud de la cadena poliadenílica sintetizada es corta, entre 4 y 20 nucleótidos en incubaciones de 30 minutos. La longitud depende de la naturaleza del RNA iniciador, así como de la concentración del mismo. Así por ejemplo, cuando se utilizan concentraciones similares de RNA de Tórula y poli(A), la longitud de la cadena es mayor con RNA de Tórula. La longitud de la cadena es mayor cuanto mayor es el tamaño del RNA iniciador cuando se utilizan los RNAs ribosomales. Este último dato se puede interpretar en función de que a igualdad de concentraciones (mg/ml), el número de cadenas de rRNA es menor cuanto mayor es el tamaño del rRNA. Es posible que la longitud de la cadena poliadenílica sintetizada sea función del número de moléculas de RNA que pueden actuar como iniciadores. Según esta hipótesis, el tamaño de la cadena poliadenílica sería mayor cuanto mayor sea el tamaño del RNA iniciador, puesto que habrá menor cantidad de moléculas para igual concentración de iniciador en términos masa/volumen. La correlación entre la longitud de la cadena poliadenílica y la cantidad de moléculas de iniciador presentes en el ensayo ha sido confirmada en los estudios de poliadenilación de las partículas ribonucleoprotéicas presentes en embriones enquistados que comentaremos posteriormente.

La longitud de la cadena sintetizada por las poli(A) polimerasas de otros sistemas eucarióticos in vitro varía entre 7 y

30 adenosinas por cadena (Haff y Keller, 1973; Winters y Edmonds, 1973 b; Niessing, 1975; Hadidi y Sethi, 1976; Milchev y Hadjio-
lov, 1978). Winters y Edmonds (1973 b) han descrito la existen-
cia de una relación inversa entre la concentración de moléculas
de iniciador y la longitud de la cadena poliadenílica sintetiza-
da.

Se ha estudiado igualmente la naturaleza del producto de
reacción cuando se utiliza dATP como nucleótido sustrato de la
reacción. Se ha podido demostrar que el enzima une una única
molécula de deoxiadenosina monofosfato al extrema 3' del RNA
iniciador. Esta conclusión está basada en el hecho de que toda
la radioactividad incorporada por el enzima a partir de dATP
marcado aparece en forma de deoxiadenosina al tratar el produc-
to de reacción con deoxirribonucleasa I y posterior hidrólisis
alcalina. La incorporación de una única molécula de dATP por
el enzima es análoga al comportamiento descrito para la deoxinu-
cleotidil terminal transferasa. Este enzima polimeriza deoxi-
nucleósidos trifosfato, uniendo los correspondientes deoxinu-
cleósidos monofosfato al extremo 3' de una molécula de DNA ini-
ciador. Se ha descrito que la deoxinucleotidil terminal trans-
ferasa es capaz de incorporar nucleósidos trifosfato en lugar de
los deoxinucleótidos, pero incorporando solamente una o dos mo-
léculas de ribonucleótido por cadena (Roychoudhury, 1972 y 1976).

La incorporación de una única molécula de dATP puede ser
interpretada a la luz de los experimentos realizados acerca de
la especificidad de iniciador del enzima. La incorporación de
una molécula de deoxiadenosina monofosfato en el extremo 3' del
RNA iniciador podría hacer perder a esta molécula de RNA su afi-
nidad por el enzima, ya que éste no puede utilizar DNA como ini-
ciador.

Hemos realizado algunos estudios encaminados a conocer el
mecanismo de reacción de la poli(A) polimerasa. Estos trabajos

se han encaminado al estudio de dos problemas: la formación del complejo enzima-sustrato y el estudio del mecanismo de elongación de la cadena poliadenílica.

Se ha estudiado la variación de la actividad enzimática al variar conjuntamente la concentración de los dos sustratos de la reacción (nucleótido y RNA iniciador). La constante de Michaelis para el nucleótido y el RNA son independientes de la concentración del otro sustrato, siempre que la concentración de ATP sea insuficiente para inhibir significativamente la actividad enzimática. Este hecho puede ser interpretado mediante la formación no ordenada de un complejo ternario, aunque no demuestra inequívocamente este mecanismo de reacción.

El segundo aspecto estudiado del mecanismo de reacción es el proceso de elongación de la cadena poliadenílica. Pueden existir dos posibilidades, que se forme un complejo estable entre el RNA iniciador y la poli(A) polimerasa, de tal forma que una única molécula de poli(A) polimerasa se una a cada molécula de RNA iniciador y se sintetiza progresivamente la cadena poliadenílica unida al iniciador. La segunda posibilidad consiste en que cada molécula de poli(A) polimerasa se una a una molécula de RNA iniciador, añadiéndole una molécula de AMP y rompiéndose el complejo inmediatamente después. Para dilucidar este problema estudiamos la evolución de la longitud de la cadena poliadenílica formada y el número de cadenas poliadeniladas con el tiempo de reacción.

La longitud de las cadenas debería aumentar indefinitivamente, en caso de ser operativo el primer mecanismo de elongación, mientras que el número de cadenas poliadeniladas no variaría sustancialmente con el tiempo de incubación. Si fuera cierto el segundo mecanismo propuesto, el número de cadenas formadas y la longitud de las mismas tendrían que aumentar linealmente con el tiempo de reacción. Los resultados experimentales han

mostrado un aumento del número de cadenas poliadeniladas con el tiempo de reacción, lo cual descarta la hipótesis de la formación de un complejo estable enzima-iniciador. La longitud de la cadena aumenta con el tiempo de incubación, pero no de forma lineal sino hiperbólica, efecto que es más acusado utilizando poli(A) como iniciador. Este dato podría interpretarse mediante un mecanismo de reacción intermedio entre los dos propuestos, de tal forma que el enzima y el iniciador formen un complejo poco estable. Durante el tiempo en que tal complejo permanece formado se podrían añadir más de una molécula de AMP al iniciador. Según esta hipótesis, la adición de moléculas de adenosina monofosfato se realizaría por pequeños segmentos de cada vez. Dado el exceso de moléculas de iniciador sobre las moléculas de enzima, a tiempos cortos de incubación la longitud media de los segmentos poliadenílicos tendería a ser la longitud del pequeño segmento añadido en cada complejo enzima-iniciador; por esta razón, la longitud de la cadena poliadenílica tendería a aumentar hiperbólicamente durante las primeras etapas de la poliadenilación.

La segunda etapa en el estudio de la enzimología de la poliadenilación durante el desarrollo de Artemia ha sido el estudio de la actividad enzimática durante el desarrollo embrionario y larvario temprano. Para ello se ha realizado la cuantificación de la actividad poli(A) polimerasa durante este período con objeto de conocer los cambios en los niveles de actividad y la importancia relativa del proceso de poliadenilación en cada etapa del desarrollo. Un segundo aspecto del problema ha consistido en el estudio de la distribución subcelular de la actividad enzimática. El conocimiento de la localización subcelular de los procesos de poliadenilación puede ofrecer información sobre la naturaleza de los RNAs poliadenilados. El tercer objetivo ha sido la caracterización de los enzimas implicados en el proceso de poliadenilación en diversas etapas del desarrollo. En embriones enquistados parece existir un único isoenzima po-

li(A) polimerasa, mientras que en otros sistemas se ha descrito la existencia de varios isoenzimas. Pudiera ser que en etapas posteriores a la gástrula y durante el desarrollo de Artemia existiera más de un isoenzima, siendo alguno de ellos inducido durante el desarrollo. En este caso, la existencia de enzimas inducibles durante el desarrollo sería de gran interés en el conocimiento de la función de dichos isoenzimas.

Los niveles de actividad poli(A) polimerasa aumentan dos veces durante el desarrollo embrionario de Artemia. La actividad existente en nauplias recién eclosionadas es doble que la existente en el embrión enquistado. La actividad poli(A) polimerasa alcanza un máximo a las 24 horas de desarrollo del embrión, disminuyendo posteriormente de forma acusada. Sin embargo, los niveles de actividad poli(A) polimerasa existentes en nauplias de edad avanzada (50 horas de desarrollo) siguen siendo superiores a los existentes en otros organismos eucarióticos.

El descenso en los niveles de actividad poli(A) polimerasa que tiene lugar entre las 22 y las 28 horas de desarrollo de las nauplias no ocurre en presencia de inhibidores de la síntesis de proteínas y los inhibidores de la síntesis de RNA reducen parcialmente el descenso de la actividad poli(A) polimerasa. Estos datos indican, aunque no demuestran, que el descenso de actividad que tiene lugar durante el desarrollo no es consecuencia únicamente de un descenso en la velocidad de síntesis del correspondiente mRNA sino que puede estar sometido a un proceso de regulación negativa dependiente de la síntesis proteica y probablemente de la síntesis de RNA.

En embriones de erizo de mar existe también un descenso en los niveles de actividad poli(A) polimerasa a lo largo del desarrollo. El descenso ocurre durante las primeras divisiones del embrión y está sometido a un proceso de regulación negativa dependiente de la síntesis proteica (Slater y col., 1978).

El aumento de la actividad poli(A) polimerasa en las etapas iniciales del desarrollo larvario es concomitante con un aumento en la velocidad de síntesis de RNA (Sebastián, 1980), así como en los niveles del enzima responsable de la síntesis de mRNA, la RNA polimerasa II (Osuna, 1979). Todos estos datos nos permiten interpretar que los elevados niveles de actividad poli(A) polimerasa existentes en esta etapa del desarrollo pueden deberse a la intensa actividad de síntesis de RNA y en particular de mRNA que parece tener lugar en este período del desarrollo de Artemia.

Se ha estudiado la distribución subcelular de la actividad poli(A) polimerasa a lo largo del desarrollo larvario de Artemia. La actividad poli(A) polimerasa se localiza en dos fracciones subcelulares, la nuclear y la citoplásmica, en todos los períodos del desarrollo estudiados. La actividad nuclear representa casi un 50% de la actividad total en las nauplias estudiadas. Esta distribución subcelular difiere marcadamente de la existente en embriones enquistados, en los que el 80% de la actividad poli(A) polimerasa tiene localización citoplásmica.

La actividad poli(A) polimerasa existente en la fracción nuclear aumenta cuatro veces entre el embrión enquistado y la nauplia recién eclosionada. Este aumento de la actividad nuclear podría ser reflejo del proceso de activación del núcleo, el cual comprendería el inicio de la síntesis de mRNA y su poliadenilación. La existencia de un proceso de activación nuclear en este período del desarrollo de Artemia queda reflejada en el aumento de la cantidad y complejidad del mRNA (James y col., 1979) como consecuencia del proceso de transcripción.

El aumento de actividad poli(A) polimerasa en la fracción nuclear puede corresponder a la inducción de una actividad poli(A) polimerasa diferente de la existente en los embriones enquistados. Alternativamente, las actividades existentes en

nauplias podría deberse al mismo enzima existente en los embriones enquistados. La naturaleza de los enzima poli(A) polimerasa existentes en nauplias de Artemia ha sido estudiado por medio de diversos enfoques experimentales. Estos enfoques han comprendido el estudio de las características de los enzimas, su comportamiento cromatográfico y la caracterización del producto de reacción originado por los enzimas particulado y soluble de nauplias de Artemia.

Las características que presenta la actividad poli(A) polimerasa en homogenados totales de nauplias de Artemia en cuanto a su punto isoeléctrico, pH óptimo y sensibilidad térmica son compatibles con la existencia de una única especie enzimática. La diferente sensibilidad térmica de los extractos de nauplias respecto al enzima parcialmente purificado de embriones enquistados puede deberse a la presencia de actividades proteolíticas en los extractos de nauplias (Olalla y col., 1978).

La actividad poli(A) polimerasa existente en las fracciones particulada y soluble de nauplias tiene el mismo comportamiento cromatográfico, tanto en columnas de intercambio iónico (DEAE-celulosa, Bio-Rex 70, Hidroxiapatito, Fosfocelulosa) como en cromatografía de afinidad (Poli(A)-Sepharosa, Poli(U)-Sepharosa, ATP-agarosa).

Se han purificado parcialmente los enzimas presentes en ambas fracciones subcelulares de nauplias de 18 horas de desarrollo. El procedimiento de purificación consta de tres etapas: cromatografía de intercambio iónico en columnas de DEAE-celulosa, precipitación fraccionada con sulfato amónico y cromatografía de gel-filtración en columnas de Sephadex G-150. Se ha podido observar una diferencia entre ambos enzimas en el proceso de purificación, consistente en el bajo rendimiento obtenido en la purificación parcial del enzima particulado. Este bajo rendimiento podría deberse a la existencia de actividades proteo-

líticas cuya localización es particulada en las primeras horas del desarrollo larvario de Artemia (Perona, 1980).

En el proceso de purificación se logró una purificación de 60 veces para el enzima particulado, con un rendimiento del 17%. Para el enzima soluble se consiguió una purificación de 70 veces y un rendimiento del 73%.

Una vez purificadas parcialmente ambas actividades se procedió a realizar un estudio comparativo de sus propiedades enzimáticas. Ambos enzimas parcialmente purificados presentan propiedades similares entre sí y con respecto al enzima de la fracción soluble de embriones enquistados. Los requerimientos de metales divalentes son iguales en todos los casos, hay un requerimiento estricto de metal, siendo máxima la actividad en presencia de manganeso. Existe una actividad menor del 10% en presencia de Magnesio y Cobalto.

La especificidad de RNA iniciador es también similar para las poli(A) polimerasas comparadas. Tienen una actividad comparable con RNA de Tórula y ácido poliadenílico, aunque la actividad relativa con ambos iniciadores depende de la fuerza iónica del medio de ensayo. Ninguno de los enzimas estudiados tiene actividad importante en presencia de ribohomopolímeros diferentes del ácido poliadenílico ni en presencia de DNA.

La especificidad para el nucleótido sustrato de la reacción es similar para los enzimas estudiados. Los enzimas tienen actividad únicamente con dos nucleótidos: el ATP y el dATP. La diferencia de actividad relativa con ATP y dATP observada en el enzima soluble de nauplias se puede deber a la utilización de diferentes cantidades de enzima en los estudios de especificidad de sustrato. Hemos expuesto anteriormente que cuando se emplea dATP como sustrato el enzima une únicamente una molécula de dAMP a cada molécula de RNA iniciador. La actividad enzimá-

tica que se expresa con dATP está limitada por el número de moléculas de RNA iniciador, no respondiendo línealmente al aumento en la cantidad de enzima presente en el ensayo. De esta forma, la actividad relativa existente con dATP y con ATP depende del número de moléculas de RNA iniciador y del enzima presente en el ensayo. Para una misma cantidad de RNA iniciador la relación de actividades dATP/ATP disminuye al aumentar la cantidad de enzima. Este hecho explicaría la diferencia en la actividad relativa existente en las preparaciones con actividad poli(A) polimerasa.

Las propiedades cinéticas de las preparaciones enzimáticas son similares por lo que respecta a la existencia de una inhibición por ATP y a los valores para la constante de Michaelis y la constante de inhibición aparentes para el ATP.

Las poli(A) polimerasas parcialmente purificadas de fracciones particulada y soluble de nauplias sintetizan una cadena poliadenílica como consecuencia de la polimerización del ATP. Se ha estudiado la longitud de la cadena poliadenílica sintetizada, la cual resultó ser similar para ambas preparaciones enzimáticas. La longitud de la cadena poliadenílica sintetizada por los enzimas de nauplias es igual a la de la cadena sintetizada por la poli(A) polimerasa de embriones enquistados.

Como resumen de los estudios de caracterización de las actividades enzimáticas existentes en las fracciones particulada y soluble de nauplias recién eclosionadas de Artemia podemos decir que se han identificado ambas actividades como correspondientes a poli(A) polimerasas. Esta identificación se ha hecho en base a los estudios de especificidad de sustrato y de la caracterización del producto de reacción como una cadena de ácido poliadenílico.

Las propiedades cromatográficas, cinéticas y de especifici-

dad presentadas por las poli(A) polimerasa de ambas fracciones subcelulares son similares entre sí y en comparación con las que presenta el enzima soluble de embriones enquistados. El estudio comparativo de las propiedades enzimáticas ha comprendido las propiedades que han permitido la identificación de más de un isoenzima poli(A) polimerasa en otros sistemas, tales como el comportamiento cromatográfico (Niessing, 1975; Haff y Keller, 1973 y 1975; Nevins y Joklik, 1977), el requerimiento de cationes divalentes (Niessing y Sekeris, 1974; Nevins y Joklik, 1977) y la especificidad de iniciador (Haff y Keller, 1973 y 1975; Nevins y Joklik, 1977).

Todas estas propiedades permiten concluir que las actividades poli(A) polimerasas existentes en las fracciones particulada y soluble de nauplias recién eclosionadas de Artemia corresponden a isoenzimas muy similares si no al mismo isoenzima.

Una vez caracterizado el sistema enzimático responsable del proceso de poliadenilación se emprendió el estudio del metabolismo del ácido poliadenílico durante el desarrollo embrionario de Artemia. Se ha estudiado en primer lugar la cantidad de ácido poliadenílico presente en los embriones. Se ha observado un aumento progresivo de la cantidad de ácido poliadenílico presente en los embriones entre la etapa de embriones enquistados en criptobiosis y las nauplias recién eclosionadas. El aumento de la cantidad de ácido poliadenílico es de cuatro veces entre los embriones en criptobiosis y los de 10 horas de desarrollo.

Se ha estudiado la distribución subcelular del ácido poliadenílico en diversos estadios del desarrollo embrionario. El ácido poliadenílico presente en embriones enquistados en criptobiosis se localiza principalmente en la fracción de mitocondrias y membranas endoplásmicas. Este dato confirma los obtenidos por Nilsson y Hultin (1975) sobre la localización del mRNA por experimentos de traducción in vitro y los comunicados por

Felicetti y col. (1975).

Existe una fracción importante de ácido poliadenílico localizado en el sobrenadante postmitocondrial de embriones enquistados. El ácido poliadenílico presente en esta fracción está en su mayor parte no asociado a ribosomas. La existencia de mRNA en esta fracción subcelular ha sido descrita por Grosfeld y Littauer (1975) y por Slegers y Kondo (1977).

Por último, una proporción del 24% del ácido poliadenílico existente en embriones en criptobiosis se encuentra asociado a la fracción de núcleos y plaquetas de vitelo. La existencia de esta fracción de ácido poliadenílico no ha sido descrita previamente. No se conoce cuál es la naturaleza de esta población de ácido poliadenílico.

Durante las primeras 10 horas del desarrollo embrionario se ha observado dos hechos de interés, por un lado el descenso en la cantidad de ácido poliadenílico ligado a membranas y por otro el aumento de la fracción de ácido poliadenílico asociado a ribosomas. El ácido poliadenílico asociado a membranas parece formar parte del mRNA almacenado en el embrión enquistado en criptobiosis, su disminución durante las primeras horas del desarrollo embrionario puede ser consecuencia de su utilización por el embrión. El aumento en la cantidad de ácido poliadenílico asociado a ribosomas puede interpretarse como un resultado del comienzo de la síntesis de proteínas, con la consiguiente formación de polisomas, proceso que tiene lugar durante las primeras horas del desarrollo embrionario de Artemia (Clegg y Golub, 1969; Amaldi y col., 1977).

La distribución subcelular del ácido poliadenílico en nauplias recién eclosionadas muestra que la mayor parte del ácido poliadenílico se encuentra asociado a ribosomas. Por otra parte, existe una fracción importante del ácido poliadenílico en

la fracción de mitocondrias y membranas. La existencia de esta fracción asociada a membranas puede deberse a la formación del retículo endoplásmico rugoso en el cual los ribosomas se encuentran asociados a membranas; la existencia de una fracción significativa del ácido poliadenílico en retículo endoplásmico rugoso puede ser consecuencia de la diferenciación de células secretoras en el embrión.

Los estudios del metabolismo del ácido poliadenílico durante el desarrollo embrionario de Artemia muestran la existencia de un proceso de incorporación del ácido poliadenílico a polisomas. Este proceso confirma la evidencia obtenida por otras vías experimentales de la activación del proceso de síntesis proteica.

La activación de la síntesis proteica tiene lugar en las primeras horas de desarrollo postgastrular del embrión, cuando también tiene lugar un aumento de la cantidad de ácido poliadenílico. Los procesos de activación de la síntesis proteica y de poliadenilación son también simultáneos en otros sistemas embrionarios tales como anfibios (Rosbash y Ford, 1974; Sagaseta y col., 1980), erizo de mar (Slater y col., 1972; Wilt, 1973 y 1977), estrella de mar (Jeffery, 1977) y algodón (Harris y Dure, 1978).

El proceso de poliadenilación que ocurre durante la embriogénesis de Artemia origina un aumento en la proporción de ácido poliadenílico existente en el RNA, que pasa de ser el 0,9% en embriones criptobióticos a ser del 2 % del RNA en nauplias de 18 horas. Nuestros resultados y los de James y col. (1979) han demostrado que el RNA poliadenilado de embriones enquistados en criptobiosis presenta una menor eficacia de traducción en sistemas in vitro que el mRNA de etapas posteriores del desarrollo. La variación de la eficacia de traducción del mRNA poliadenilado con el tiempo de desarrollo de los embriones es paralela a la variación de la cantidad de ácido poliadenílico presente en los

embriones.

La correlación entre los procesos de poliadenilación de los mRNAs, la activación del proceso de síntesis proteica y el aumento de la eficacia de traducción de los mRNAs ha llevado a varios autores a postular que el proceso de poliadenilación puede actuar como proceso de desencadenante de la activación de los mRNAs en sistemas en desarrollo (Slater y col., 1973; Wilt, 1973; Harris y Dure, 1978).

Según esta hipótesis de trabajo los mRNAs presentes en embriones enquistados sufrirían un proceso de poliadenilación en las etapas iniciales del desarrollo embrionario. En el estudio de la poliadenilación durante el desarrollo embrionario de Artemia hemos indagado la capacidad de la poli(A) polimerasa parcialmente purificada de embriones enquistados para poliadenilar in vitro los mRNAs de embriones enquistados en fase de criptobiosis.

Hemos realizado algunos estudios previos con el fin de caracterizar los componentes celulares de los que forma parte el RNA poliadenilado de embriones enquistados. Se ha estudiado el RNA poliadenilado existentes en las fracciones de mitocondrias y membranas y en la fracción del sobrenadante postmitocondrial. En ambas fracciones el ácido poliadenílico se encuentra asociado con proteínas, formando complejos ribonucleoproteicos. Esta conclusión se basa en los estudios de centrifugación de las fracciones subcelulares en gradientes isopícnicos de sacarosa. La densidad de flotación del componente celular del que forma parte el ácido poliadenílico es intermedia entre la de los ácidos nucleicos y la de las proteínas, pudiendo por tanto decirse que el ácido poliadenílico se encuentra formando parte de un complejo formado por ácidos nucleicos y proteínas.

La asociación del RNA poliadenilado con proteínas, formando

complejos ribonucleoproteicos no asociados a ribosomas ha sido descrita para otros sistemas embrionarios, tales como oocitos de erizo de mar (Infante y Nemer, 1968; Gross y col., 1973; Kautzner y col., 1978), *Drosophila* (Lovett y Goldstein, 1977) o semillas de trigo (Ajtkozhin y col., 1976). En embriones enquistados de Artemia también se ha descrito la asociación del RNA poliadenilado con proteínas (Grosfeld y Littauer, 1975; Slegers y Kondo, 1977a; Amaldi y col., 1977, Simons y col., 1978).

Se han purificado los complejos ribonucleoproteicos existentes en embriones criptobióticos de Artemia por cromatografía de afinidad en columnas de Oligo(dT)-celulosa, tanto los existentes en la fracción de mitocondrias y membranas como los que se localizan en el sobrenadante postmitocondrial. La purificación de los complejos de membranas supuso la solubilización previa por tratamiento de la fracción de mitocondrias y membranas con Tritón X-100. Los complejos ribonucleoproteicos purificados conservan la densidad de flotación que presentaba el ácido poliadenílico en las fracciones subcelulares originales. Este dato avala la integridad de los complejos ribonucleoproteicos purificados.

La densidad de flotación en sacarosa de los complejos purificados a partir de las fracciones de membranas es $1,24 \text{ g/cm}^3$, la densidad estimada para la fracción del sobrenadante postmitocondrial es de $1,26 \text{ g/cm}^3$, indicando una diferente proporción de RNA/proteínas para ambos tipos de complejos, proporción que es mayor para los complejos de la fracción postmitocondrial.

Los componentes proteicos de ambos tipos de partículas han sido caracterizados por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS. En los complejos de la fracción de membranas se han identificado al menos 8 proteínas de pesos moleculares: 90.000, 67.000, 45.000, 38.000, 34.000, 31.000, 23.500 y 22.000 D. En los complejos existentes en el sobrenadante post-

mitocondrial se han podido caracterizar al menos 8 componentes proteicos, de pesos moleculares: 110.000, 86.000, 76.000, 37.000, 30.000, 25.000, 23.500 y 20.500 D, siendo muy mayoritaria la proteína de 37.000 D. de peso molecular. La composición proteica de los complejos ribonucleicos libres descrita en otros sistemas es muy variada, habiendo únicamente 2 proteínas que parecen ser constantes en estos sistemas, cuyos pesos moleculares respectivos son de 49-52.000 D. y 75-80.000 D. (Egly y col., 1974 y 1975; Bag y Sarkar, 1975; Barrieux y col., 1975 y 1976). Únicamente la de 75.000 podría estar representada en los complejos de Artemia, no siendo mayoritaria.

La proteína mayoritaria en complejos del sobrenadante post-mitocondrial tiene un peso molecular similar a una proteína que es el componente principal de los complejos ribonucleoproteicos heterogéneos nucleares (Preobrazhensky y Spirin, 1978). Esta proteína es, por otra parte, similar a una proteína de Artemia con gran capacidad de asociación con ácidos nucleicos de cadena sencilla, la cual inhibe la traducción in vitro (Marvill y col., 1980; Nowak y col., 1980). No se han descrito estudios similares de composición de complejos ribonucleoproteicos en otros sistemas embrionarios. La diferente composición proteica de ambos tipos de complejos ribonucleoproteicos (ligados a membranas y libres), así como su diferente densidad de flotación, permite afirmar que ambos tipos de complejos son entidades diferentes, no un mismo tipo de complejos con dos posibilidades de localización subcelular.

Se ha caracterizado el RNA constitutivo de las partículas ribonucleoproteicas por electroforesis en gel de agarosa. Ambos tipos de partículas poseen un RNA cuyo coeficiente de sedimentación varía entre 8 y 14 S. Este resultado es concordante con los obtenidos por Slegers y Kondo (1977) para el RNA de partículas postmitocondriales y por James y col. (1979) para el RNA poliadenilado total de los embriones enquistados.

Una vez purificados los complejos ribonucleoproteicos poliadenilados existentes en embriones enquistados se procedió al estudio de su poliadenilación in vitro. El objetivo principal de este estudio era conocer la capacidad de la poli(A) polimerasa parcialmente purificada a partir de fracciones solubles de embriones enquistados para poliadenilar los complejos ribonucleoproteicos homólogos.

Se ha observado que la poli(A) polimerasa puede utilizar los complejos ribonucleoproteicos homólogos como iniciadores. La reacción de poliadenilación es dependiente de la concentración de complejos ribonucleoproteicos, habiéndose podido determinar una constante de Michaelis de 17 y 14 nM. para los complejos de membranas y de la fracción postmitocondrial respectivamente. Los RNAs purificados a partir de los complejos ribonucleoproteicos pueden ser también poliadenilados por el enzima homólogo; la constante de Michaelis para los RNAs es, al menos, dos órdenes de magnitud superior a la que presentan los complejos ribonucleoproteicos.

La mayor capacidad de los complejos para ser poliadenilado con respecto al RNA contrasta con la capacidad de traducción in vitro de ambas entidades, puesto que los complejos ribonucleoproteicos no dirigen la síntesis proteica in vitro mientras que los RNAs sí que la dirigen (Grosfeld y Littauer, 1975; Slegers y col, 1979). Estos datos muestran que la reacción de poliadenilación puede llevarse a cabo sobre los complejos ribonucleoproteicos sin modificación de su estructura, mientras que la traducción no puede efectuarse en estas condiciones.

La reacción de poliadenilación de los complejos ribonucleoproteicos presenta un período inicial de activación de la reacción. Este período es mucho más prolongado en el proceso de poliadenilación de los RNAs purificados de los complejos. Ambos datos confirman los resultados obtenidos anteriormente en los

estudios de caracterización cinética del enzima, con la ventaja de haberse utilizado en este caso sustratos naturales del enzima.

La longitud de la cadena poliadenílica sintetizada por el enzima en el transcurso de la reacción de poliadenilación de las partículas puede llegar a ser equivalente a la cadena de ácido poliadenílico preexistente en las partículas. La longitud de la cadena sintetizada depende de la relación existente entre la actividad enzimática y la cantidad de partículas existentes en el medio de ensayo.

La posibilidad de obtener una poliadenilación significativa de los complejos ribonucleoproteicos en reacciones de poliadenilación in vitro hacen a Artemia un sistema interesante en el estudio del significado biológico del proceso de poliadenilación de los mRNAs almacenados en los sistemas embrionarios. Este sistema tiene la ventaja de que permite el estudio de los mRNAs en su propio entorno, es decir, unido a las proteínas a las que está asociado in vivo.

V. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Se ha identificado una actividad poli(A) polimerasa en la fracción citosólica de los embriones en criptobiosis de Artemia y se ha purificado unas 100 veces el enzima responsable de esta actividad. El enzima posee un peso molecular de 70.000 daltons y un punto isoeléctrico de 6.
2. Se han estudiado las propiedades de pH óptimo, estabilidad térmica, dependencia de la fuerza iónica y especificidad del enzima. El enzima de embriones criptobióticos utiliza como iniciadores RNA heterogéneos y el ácido poliadenílico. Como sustratos utiliza los nucleótidos de adenina, ATP y dATP, siendo 5 veces menor la actividad con este último sustrato. La reacción enzimática presenta una inhibición por ATP debida a la unión de este sustrato al sitio de interacción del enzima con el RNA iniciador. Esta inhibición no se produce con dATP.
3. El producto de reacción de la poli(A) polimerasa es una cadena de ácido poliadenílico unida covalentemente al extremo 3' del RNA iniciador. La longitud de la cadena poliadenílica es de 5-10 nucleótidos en incubaciones de 30 minutos con ATP. Cuando se utiliza dATP como sustrato el enzima añade una única molécula de dAMP al RNA iniciador.
4. La actividad total poli(A) polimerasa varía con el desarrollo embrionario posgastrular y larvario de Artemia. La actividad enzimática es máxima en nauplias recién emergidas y disminuye posteriormente durante el desarrollo larvario.
5. La localización subcelular de la actividad poli(A) polimerasa también varía con el desarrollo embrionario de Artemia. La proporción de enzima particulado se duplica durante el desarrollo embrionario posgastrular.
6. Las actividades poli(A) polimerasa de las fracciones particulada y soluble de nauplias han sido purificadas parcialmente y caracterizadas. Las propiedades cromatográficas, cinéticas

y de especificidad de ambas actividades son similares entre sí e iguales a las que presenta el enzima de embriones criptobióticos, por lo que se concluye que en Artemia existe un único isoenzima poli(A) polimerasa.

7. La cantidad de ácido poliadenílico presente en los embriones de Artemia aumenta cuatro veces durante el desarrollo embrionarioposgastrular. El ácido poliadenílico existente en los embriones en criptobiosis se localiza fundamentalmente en las fracciones de mitocondrias y membranas y en la fracción posmitocondrial. Tras la reanudación del desarrollo embrionario se observa un aumento en la cantidad de ácido poliadenílico en la fracción de microsomas y en la de núcleos+plaquetas, así como una disminución del poli(A) presente en la fracción de membranas.
8. El ácido poliadenílico presente en los embriones en criptobiosis se encuentra asociado a proteínas, formando complejos o partículas ribonucleoprotéicas. Se han purificado los complejos ribonucleoprotéicos de las fracciones de membranas + mitocondrias y de la fracción posmitocondrial de embriones en criptobiosis.
9. Se han caracterizado los componentes de los complejos ribonucleoprotéicos purificados. Los complejos asociados a la fracción de membranas + mitocondrias constan, al menos, de 8 proteínas diferentes, de pesos moleculares de 90.000, 67000, 45000, 37000, 34000, 31000, 23500 y 22000. Los componentes protéicos de los complejos de la fracción posmitocondrial son un mínimo de 8, de pesos moleculares de 110000, 86000, 77000, 37000, 30000, 25000, 23500 y 20500. Ambos tipos de partículas poseen moléculas de RNA de 80000-120000 daltons. Estos RNAs están poliadenilados y pueden traducirse en un sistema libre de células de reticulocitos de conejo.
10. Se ha demostrado que los complejos ribonucleoprotéicos purificados pueden ser poliadenilados in vitro por la poli(A) polimerasa parcialmente purificada de embriones criptobióticos.

La poli(A) polimerasa tiene una gran afinidad por las partículas de ribonucleoproteína. La constante de Michaelis para los complejos es al menos dos órdenes de magnitud inferior a las constantes obtenidas para los RNAs purificados a partir de los complejos. La longitud de la cadena de poli(A) añadida in vitro a los complejos es igual o superior a la longitud de la cadena de poli(A) preexistente en los RNAs de las partículas.

11. El aumento en la cantidad de poli(A) en las primeras etapas del desarrollo embrionario posgastrular de Artemia, así como la capacidad de poliadenilación de las partículas de ribonucleoproteína que contienen los RNA mensajeros almacenados en las gástrulas, apoyan la hipótesis del papel de la poliadenilación en la activación durante el desarrollo de los RNA mensajeros almacenados. La activación tendría lugar mediante la elongación de la cadena de poli(A) preexistente. Esta elongación produciría un cambio en la estructura del RNA mensajero y en su interacción con las proteínas en las partículas, posibilitando su traducción.

BIBLIOGRAFIA

- Abelson, J. (1979). RNA processing and intervening sequence problem. Ann. Rev. Biochem. 48, 1035-1069
- Adams, J.M. (1978). Messenger RNA. The Ribonucleic Acid. Chapter 4, pg. 81-128. Ed.: P.R. Steward y D.S. Letham. Springer-Verlag. New York-Heidelberg-Berlin.
- Adesnik, M. y Darnell, J.E. (1972). Biogenesis and characterization of histone messenger RNA in HeLa cells. J. Mol. Biol. 67, 397-406
- Ajtkhozhin, M.A., Doschanov, Kh. J. y Akhanov, A.U. (1976) Informosomes as a stored form of mRNA in Wheat embryos. FEBS. Letters 66, 124-126
- Allende, C.C., Allende, J.E. y Firtel, R.A. (1974). The degradation of ribonucleic acids injected into Xenopus laevis oocytes. Cell, 2, 189-196
- Amaldi, P.P., Felicetti, L. y Campioni, N. (1977). Flow of informational RNA from cytoplasmic poly(A) containing particles to polyribosomes in Artemia salina cysts of early stages of development. Develop. Biol., 59, 49-61
- Avramova, Z.V., Milchev, G.I. y Hadjiolov, A.A. (1980). Two distinct poly(A) polymerases isolated from the cytoplasm of Ehrlich ascites tumour cells. Eur. J. Biochem., 103, 99-107.
- Bachvarova, R., Davidson, E.H., Allfrey, U.G. y Mirsky, A.E. (1966). Activation of RNA synthesis associated with gastrulation. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 55, 358-363.
- Bachvarova, R. y Davidson, E.H. (1966). Nuclear activation at the onset of amphibian gastrulation. J. Exp. Zool., 163, 285-300.

- Bag, J. y Sarkar, S. (1975). Cytoplasmic non-polysomal messenger ribonucleoprotein containing acting messenger RNA in chicken embryonic muscles. Biochem., 14, 3800-3807
- Barigozzi, C. (1974). Artemia: a survey of its significance in genetics problems. Evolutionary Biology, 7, 221-252
- Barrieux, A., Ingraham, H.A., David, D.N. y Rosenfeld, M.G. (1975). Isolation of messenger-like ribonucleoproteins. Biochem., 14, 1815-1821
- Barrieux, A., Ingraham, H.A., Nystul, S. y Rosenfeld, M.G. (1976) Characterization of the association of specific proteins with messenger ribonucleic acid. Biochem., 15, 3523-3528
- Berget, S.M., Moore, C. y Sharp, P.A. (1977). Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 74, 3171-3175
- Berk, A.J. y Sharp, P.A. (1978). Spliced early mRNAs of simian virus 40. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 75, 1274-1278
- Blobel, G. (1973). A protein of molecular weight 78.000 bound to the poly adenylate region of eukaryotic messenger RNAs. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70, 924-928
- Bollum, F.J. (1978). Terminal deoxynucleotidil transferases: biological studies. Adv. Enzimology, 47, 347-374
- Brachet, J., Ficq, A. y Tencer, R. (1963). Amino acid incorporation into proteins of nucleate and anucleate fragments of sea urchin eggs: effect of parthenogenetic activation. Exp. Cell Res., 32, 168-170
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 72, 248-254
- Brakel, C. y Kates, J.R. (1974). Poly(A) Polymerases from Vaccinia virus infected cells. II Product and primer Characterization. J. Virol., 14, 724-732

- Brandhorst, B.P. y Bannet, M. (1978). Terminal completion of poly(A) synthesis in sea urchin embryos. Develop. Biol. 63, 421-431
- Brawerman, G. (1963). A procedure for the isolation of RNA fractions resembling DNA with respect to nucleotide composition. Biochem. Biophys. Acta., 76, 322-324
- Brawerman, G. (1973). Alterations in the size of the poly(A) segment in newly-synthesized messenger RNA of mouse carcinoma 180 ascites cells. Mol. Biol. Rep., 1, 7-13
- Brawerman, G. (1974). Eukaryotic messenger RNA. Ann. Rev. Biochem. 43, 621-642
- Brawerman, G. y Diez, J. (1975). Metabolism of the polyadenylate sequence of nuclear RNA and messenger RNA in Mammalian cells. Cell, 5, 271-280
- Brawerman, G. (1976). Characteristic and significance of the polyadenylate sequence in mammalian messenger RNA. Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol., 17, 117-148
- Brentani, M., Dos Santos, C.L.S., D'abronzo, H. y Brentani, R.R. (1979). Contribution of polyadenylic acid sequence to the maintenance of secondary structure of globin messenger RNA. Biochem. Biophys. Res. Com., 90, 338-346
- Cabada, M.O., Darnborough, C., Ford, P.J. y Turner, P.C. (1977). Differential accumulation of two size classes of poly(A) associated with messenger RNA during oogenesis in Xenopus laevis. Develop. Biol., 57, 427-439
- Cano, A. y Pestaña, A. (1976). Regulation of histone acetyl transferase during the development of Artemia salina. Characterization of an inhibitor in nauplius larvae. Develop. Biol., 54, 276-287
- Cano, A. y Pestaña, A. (1979). Purification and properties of a histone acetyl transferase from Artemia salina, highly efficient with H1 histone. Eur. J. Biochem., 97, 65-72

- Cano, A., Cruces, J., Estepa, I., Gallego, M.E., Gunther, M.A., Heredia, C.F., Llorente, P., Olalla, A., Osuna, C., Pestaña, A., Renart, J., Ruiz, A., Sastre, L., Sebastián, J. y Sillero, A. (1980). Developmental changes of enzyme levels during Artemia salina differentiation. *Biochemistry of Artemia development*. pg. 150-166. Ed.: J.C. Bagshaw y A.H. Warner. Univeristy Microfilms International. Ann Arbor, Michigan
- Cardelli, J., Long, B. y Pitot, H.C. (1976). Direct association of messenger RNA labelled in the presence of fluoroorotate with membranes of the endoplasmic reticulum in rat liver. J. Cell. Biol., 70, 47-58
- Cervera, M., Martín, E., Domingo, A., Vallejo, C.G. y Marco, R. (1980). DNase activity during Artemia development. *The Brine shrimp Artemia*. Vol. LL, pg. 293-304. Ed.: G. Persoone, P. Sargeloos, O. Roels y E. Jaspers. Universa Press, Eteren, Belgium
- Civelli, O., Vincent, A., Buri, J.F. y Scherrer, K. (1976). Evidence for a translational inhibitor linked to globin mRNA in untranslated free cytoplasmic messenger ribonucleoprotein complexes. FEBS Letters, 72, 71-76
- Clegg, J.S. y Golub, A.L. (1969). Protein synthesis in Artemia salina. II. Resumption of RNA and protein synthesis upon cessation of dormancy in the encysted gastrula. Develop. Biol., 19, 178-200
- Clegg, J.S. (1978). Hydration-dependent metabolic transitions and the state of cellular water in Artemia. *Dry biological systems*. Ed.: J.H. Crowc y J.S. Clegg. Academic Press. New York. pg. 117-153
- Coleman, M.S., Hutton, J.J. y Bollum, F.J. (1974). Terminal riboadenylate transferase in human lymphocytes. Nature, 248, 407-409

- Conte, F.P., Droukas, P.C. y Ewing, R.D. (1977). Development of sodium regulation and de novo synthesis of Na-K-activated ATPase in larval brine shrimp Artemia salina. J. Exp. Zool., 202, 339-361
- Chan, L.-N.L. (1976). Transport of globin mRNA from nucleus into cytoplasm in differentiating embrionic red blood cells. Nature (London), 261, 157-159
- Darnell, J.E., Philipson, L., Wall, R. y Adesnik, M. (1971) Polyadenylic acid sequences: role in conversion of nuclear RNA into messenger RNA. Science, 174, 507-510
- Davidson, E.H. (1976). Gene activity in early development. Academic Press, New York
- Davidson, E.H., Britten, R.J. (1979). Regulation of gene expression: possible role of repetitive sequences. Science, 204, 1052-1059
- Davidson, E.H., Constantini, F.D., Losky, L.A. y Thomas, T.L. (1980). Sequence organization and gene expressions in sea urchin development. E.J. Cell Biology, 22, 3
- De Chaffoy, D. y Kondo, M. (1980). Lipovitellin from the crustacean Artemia salina. Biochemical analysis of lipovitellin complex from the yolk granules. J. Biol. Chem., 255, 6727-6733
- De Herdt, E., Slegers, H. y Kondo, M. (1979). Template active 18S RNP Particle lacking poly(A) - residues in cryptobiotic salina gastrulae. Eur. J. Biochem., 96, 423-430
- Denny, P.C. y Tyler, A. (1964). Activation of protein synthesis in non-nucleate fragments of sea urchin eggs. Biochem. Biophys. Res. Com., 14, 245-249
- Deshpaude, A.K., Chatterjee, B. y Roy, A.K. (1979). Translation and Stability of Rat liver messenger RNA for -Globulin in Xenopus Oocyte. J. Biol. Chem., 254, 8937-8942

- Diaz, J. y Brawerman, G. (1974). Elongation of the Polyadenylate Segment of messenger RNA in the cytoplasm of mammalian cells. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71, 4091-4095
- Dingman, C.W. y Sporn, M.B. (1962). The isolation and physical characterization of nuclear and microsomal ribonucleic acid from rat brain and liver. Biochem. Biophys. Acta, 61, 164-177
- Dolecki, G.J., Duncan, R.F. y Humphreys, T. (1977). Complete turnover of poly(A) on maternal mRNA of sea urchin embryos. Cell, 11, 339-344
- Dutrieu, J. (1960). Observations biochimiques et physiologiques sur le développement d'artemia salina Leach. Archives de Zoologie expérimentale et générale, 99, 1-134
- Early, P., Rogers, J., Davis, M., Calaine, K., Bond, M., Wall, R. y Hood, L. (1980). Two mRNAs can be produced from a single immunoglobulin Gene by alternative RNA processing pathways. Cell, 20, 313-320
- Edmonds, M. y Abrams, R. (1960). Polynucleotide Biosynthesis: formation of a sequence of adenylate units from adenosine triphosphate by an enzyme from Thymus Nuclei. J. Biol. Chem., 235, 1142-1149
- Edmonds, M. y Winters, M.A. (1976). Polyadenylate Polymerases. Proc. Nuc. Acid Res. and Mol. Biol., 17, 149-179
- Egly, J.M., Krieger, O., Mandel, P. y Kempf, J. (1974). Isolation of proteins with high affinity for dRNA. FEBS. lett. 40, 101-105
- Egly, J.M., Krieger, O. y Kempf, J. (1975). Purification of a protein with high affinity for dRNA. FEBS lett., 83, 64-68

- Ewing, R.D., Peterson, G.J. y Conte, P.F. (1974). Larval salt gland of Artemia salina nauplii. Localization and characterization of the sodium+potassium-activated adenosina triphosphatase. J. Comp. Physiol., 88, 217-234
- Felicetti, L., Pierandrei, P., Campioni, N. y Urbani, L. (1975) Intracellular distribution, sedimentation values and template activity of polyadenylic acid containing RNA stored in Artemia salina cysts. Cell Differentiation, 4 339-354
- Filipowicz, W., Sierra, J.M. y Ochoa, S. (1975). Polypeptide chain initiation in eukaryotes: Initiation factor in Artemia salina embryos. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 3947-3951
- Filipowicz, W., Sierra, J.M., Nombela, C., Ochoa, S., Merrick, Anderson (1976). Polypeptide chain initiation in eukaryotes: Initiation factor requirements for translation of natural messengers. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 73, 44-48
- Finamore, F.J. y Clegg, J.S. (1969). Biochemical aspects of morphogenesis in the brine shrimp Artemia salina. The Cell Cycle. Ed.: Padilla, G.M. Academic Press, New York, 249-278
- Galau, G.A., Klein, W.N., Davis, M.M., Wold, B.J., Britten, R.J. y Davidson, G.H. (1976). Structural gene sets active in embryos and adult tissues of the sea urchin. Cell, 7, 487-505
- Gallego, M.E. (1980). Deacilación de aminoacil-tRNAs durante el desarrollo de Artemia salina: caracterización de una nueva actividad aminoacil-tRNA hidrolasa. Tesis Doctoral. Fac. Ciencias UAM.

- Garen, A. y Levinthal, C. (1960). A fine-structure genetic and chemical study of the enzyme alkaline phosphatase of E. coli. I Purification and characterization of alkaline phosphatase. Biochem. Biophys. Acta, 38, 470-483
- Getz, M.J., Birnie, G.D., Young, B.D., MacPhail, E. y Paul, J. (1975). Kinetic estimation of base sequence complexity of nuclear poly(A)-containing RNA in mouse friend cells. Cell, 4, 121-129
- Giron, M.L. y Huppert, J. (1972). Polyadenylate synthèse des cellules d'ascite de souris. I Purification et caractérisation de l'enzyme. Biochem. Biophys. Acta, 287, 438-449
- Goldstein, E.S. (1978). Translated and sequestered untranslated message sequences in Drosophila Oocytes and embryos. Develop. Biol., 63, 59-66
- Gorski, J., Morrison, M.R., Merkel, C.G. y Lingrel, J.B. (1974) Size heterogeneity of polyadenylate sequences in mouse globin messenger RNA. J. Mol. Biol., 86, 363-371
- Greenberg, J.B. y Perry, R.P. (1972). Relative occurrence of polyadenylic acid sequences in messenger and heterogeneous nuclear RNA of L cells as determined by poly(U)-hydroxylapatite chromatography. J. Mol. Biol., 72, 91-98
- Greenhouse, G.A., Hynes, R.O. y Gross, P.R. (1971). Sea urchin embryos are permeable to actinomycin. Science, 171, 636-689
- Groner, B., Hynes, N. y Phillips, S. (1974). Length heterogeneity in the poly (adenylic acid) region of yeast messenger ribonucleic acid. Biochemistry, 13, 5378-5383
- Groner, Y., Grosfeld, H. y Littauer, U.Z. (1976). 5'-capping structures of Artemia salina mRNA and the translational inhibition by cap analogs. Eur. J. Biochem., 71, 231-293

- Grosfeld, H. y Littauer, U.Z. (1975). Criptic forms of mRNA in dormant Artemia salina cysts. Biochem. Biophys. Res. Com., 67, 176-181
- Grosfeld, H. y Littauer, U.Z. (1976). The translation in vitro of mRNA from developing cysts of Artemia salina. Eur. J. Biochem., 70, 589-599
- Gross, P.R. y Cousineau, G.H. (1964). Macromolecule synthesis and the influence of actinomycin on early development. Exp. Cell. Res., 33, 368-395
- Gross, K.W., Jacob-Lorena, M., Baglioni, C. y Gross, P.R. (1973) Cell-free translation of maternal messenger RNA from sea urchin eggs. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70, 2614-2618
- Gurdon, J.B. y Woodland, H.R. (1969). The influence of the cytoplasm on the nucleus during cell differentiation, with special reference to RNA synthesis during amphibian cleavage. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 173, 99-111
- Gurdon, J.B., Lane, C.D., Woodland, H.R. y Marbaix, G. (1971) Use of frog eggs and oocyte for the study of messenger RNA and its translation in living cells. Nature (London), 233, 177-182
- Hadidi, A. y Sethi, S. (1976). Poly(A) polimerase from cytoplasm and nuclei of N.I.H.-Swiss mouse embryos. Biochem. Biophys. Acta, 425, 95-109
- Haff, L.A. y Keller, E.B. (1973). Two distinct poly(A) polymerases in yeast nuclei. Biochem. Biophys. Res. Com., 51, 704-710
- Haff, L.A. y Keller, E.B. (1975). The polyadenylate polymerases from yeast. J. Biol. Chem., 250, 1838-1846
- Hammet, J.R. y Katterman, F.R. (1975). Storage and metabolism of poly(adenylic acid)-mRNA in germinating cotton seeds. Biochemistry, 14, 4375-4379

- Harris, B. y Dure, L. (1978). Developmental regulation in cotton seeds germination: polyadenylation of stored messenger RNA. Biochemistry, 17, 3250-3256
- Heip, J., Moens, L. y Kondo, M. (1978 a). Effect of concentrations of salt and oxygen on the synthesis of extracellular hemoglobins during development of Artemia salina. Develop. Biology, 63, 247-251
- Heip, J., Moens, L., Janian, M. y Kondo, M. (1978 b). Ontogenetical studies on extracellular hemoglobins of Artemia salina. Develop. Biol., 64, 73-81
- Herman, R.C, Williams, J.G. y Penman, S. (1976). Message and non-message sequences adjacent to poly(A) in steady-state heterogeneous nuclear RNA of HeLa cells. Cell, 7, 429-437
- Hickey, E.D., Weber, L.A. y Baglioni, C. (1976). Translation of RNA from unfertilized sea urchin eggs does not require methylation and is inhibited by 7-methylguanosine-5'-monophosphate. Nature, 262, 71-73
- Houdebine, L.M. (1976). Absence of poly(A) in a large part of newly synthesized casein mRNAs. FEBS letters, 66, 110-113
- Hsu, M.T. y Ford, J. (1977). Sequence arrangement of the 5' ends of simian virus 40, 16S and 19S mRNAs. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 74, 4982-4985
- Huez, G., Marbaix, G., Hubert, E., Leclercq, M., Nudel, U., Soreq, M., Salomon, R. y Leblen, B. (1974). Role of the polyadenylate segment in the translation of globin messenger RNA in Xenopus oocytes. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71, 3143-3146
- Huez, G., Marbaix, G., Hubert, E., Clenter, Y., Leclercq, M., Chartrenne, H., Devos, R., Soreq, H., Nudel, U. y Littauer, U.Z. (1975). Readenylation of polyadenylate-free globin messenger RNA restores its stability in vivo. Eur. J. Biochem., 59, 589-592

- Hultin, T. y Morris, J.E. (1968). The ribosomes of encysted embryos of Artemia salina during cryptobiosis and resumption of development. Develop. Biol., 17, 143-164
- Humphreys, T. (1973). RNA and protein synthesis during early animal embryogenesis. Developmental regulation, aspects of cell differentiation. Ed.: S.J. Coward. pg.1. Academic Press (New York)
- Ilan, J. e Ilan, J. (1978). Translation of maternal messenger ribonucleoprotein particles from sea urchin in a cell-free system from unfertilized eggs and product analysis. Develop. Biol., 66, 375-385
- Infante, A.A. y Nemer, M. (1968). Heterogeneous ribonucleoprotein particles in the cytoplasm of sea urchin embryos. J. Mol. Biol., 32, 543-565
- Jacob, S.T. y Schindler, D.G. (1972). Polyriboadenylate polymerase solubilized from rat liver mitochondria. Biochem. Biophys. Res. Com., 48, 126-134
- Jacob, S.T., Roe, F.J. y Rose, K.M. (1976). Chromatin-bound and free forms of poly(Adenylic acid) polymerase in rat hepatic nuclei. Biochem. J., 153, 733-735
- James, T.C., Hentschel, C.C. y Tata, J.R. (1979). Gene expression during resumption of development of encysted Artemia gastrulae. Biochemistry of Artemia development. Ed.: Bogshaw, J.C. y Warner, A.H. University Microfilms International. pg. 167-189
- Jeffery, W.R. y Brawerman, G. (1974). Characterization of the steady-state population of messenger RNA and the poly (adenylic acid) segment in mammalian cells. Biochemistry, 13, 4633-4637
- Jeffery, W.R. (1977). Polyadenylation of maternal and newly-synthesized RNA during Starfish oocyte maturation. Develop. Biol., 57, 98-108

- Jelinek, W.R. (1974). Polyadenylic acid synthesis in vitro in isolated HeLa cells nuclei and whole cell homogenates. Cell, 2, 197-204
- Jenkins, N.A., Taylor, M. y Roff, R.A. (1973). In vitro translation of oogenetic messenger RNA of sea urchin eggs and piconavirus RNA with a cell free system from sarcoma 180. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70, 3287-3291
- Jenkins, N.A., Kaumeyer, J.F., Young, E.M. y Raff, R.A. (1978). A test for masked message: the template activity of messenger ribonuclein particles isolated from sea urchin eggs. Develop. Biol., 63, 279-298
- Karpetsky, T.P., Boguski, M.S. y Levy, C.C. (1979). Structures, properties and possible biological functions of polyadenylic acid. Subcellular Biochemistry Vol. 6 Chapter 1, pg. 1-116. E.O.B. Roodyn. Plenum Press
- Kaumeyer, J.F., Jenkins, N.A. y Raff, R.A. (1978). Messenger ribonucleoprotein particles in unfertilized sea urchin eggs. Develop. Biol., 63, 266-278
- Kleene, K.C., Humphreys, T. (1977). Similarity of hnRNA sequences in blastula and pluteus stage sea urchin embryos. Cell, 12, 143-155
- Koch, S. y Niessing, J. (1978). Mode of inhibition of nuclear poly(A) polymerase by 2'dATP and 3'dATP. FEBS Letters, 96, 354-356
- Kornberg, A. (1980). DNA replication. Ed.: W.H. Freeman and Co.
- Kumar, A. y Pederson, J. (1975). Comparison of protein bound to heterogeneous nuclear RNA and messenger RNA in HeLa cells. J. Mol. Biol., 96, 353-365
- Laemmli, V.K. (1970). Cleavage of structural protein during the assembling of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680-685

- Laidler, K.J. y Bunting, P.S. (1973). The chemical kinetic of enzyme action. Clarendon press.
- Lee-Huang, S., Sierra, J.M., Filipowicz, W. y Ochoa, S. (1976). Translational inhibitors and activators in Artemia salina embryos. Fed. Proceedings, 35, 1728
- Lev, Z., Thomas, T.L., Lee, A.S., Angerer, R.C., Britten, R.J. y Davidson, E.H. (1980). Developmental expression of two cloned sequences coding for rare sea urchin embryo messages. Develop. Biol., 76, 322-340
- Levy, B. y McCarthy, B.J. (1976). Relationship between nuclear and cytoplasmic RNA in Drosophila cells. Biochemistry, 15, 2415-2419
- Lewin, B. (1975). Units of transcription and translation: the relationship between heterogeneous nuclear RNA and messenger RNA. Cell, 4, 11-20
- Lovett, J.A. y Goldstain, E.S. (1977). The cytoplasmic distribution and characterization of poly(A)+RNA in oocytes and embryos of Drosophila. Develop. Biol., 61, 70-78
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.C., Far, A.L. y Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275
- McDonell, M.W., Simon, M.W. y Studier, F.W. (1977). Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weight by electrophoresis in neutral and alkaline gels. J. Mol. Biol., 110, 119-146
- McRae, T.H., Woodley, C.K. y Wahba, A.J. (1979). Characterization of polypeptide chain initiation factors during Artemia salina development. Biochemistry of Artemia development, pg. 2-21. Ed: J.C. Bagshaw y A.H. Warner. University Microfilm International.

- Mans, R. y Stein, G. (1974). Addition of polyadenylic acid to RNA by ATP: polynucleotidyl exo transferase partially purified from HeLa cells. Life Science, 14, 437-445
- Marbaix, G., Huez, G., Burny, A., Clenter, Y., Hubert, E., Leclercq, M., Chantreune, H., Soreq, M., Nudel, U. y Littauer, U.Z. (1975). Absence of polyadenylate segment in globin messenger RNA accelerates its degradation in Xenopus oocytes. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 3065-3067
- Marco, R., Garesse, R. y Vallejo, C.G. (1980). Mitochondrial unmasking and yolk platelets metabolization during early development in Artemia. The Brine Shrimp. Vol. II., pg. 481-490. Ed.: G. Persoone, P. Sorgeloos, D. Roels y D. Jaspers. Universal Press. Wetteren, Belgium
- Marvil, D.K., Nowak, L. y Szer, W. (1980). A single-stranded nucleic acid-binding protein from Artemia salina. I. Purification and characterization. J. Biol. Chem., 255, 6466-6472
- Mazur, G. y Schweiger, A. (1978). Identical properties of an mRNA-bound protein and a cytosol protein with high affinity for polyadenylate. Biochem. Biophys. Res. Com., 80, 39-45
- Mendecki, J., Lee, S.Y. y Brawerman, G. (1972). Characteristics of the polyadenylic acid segment associated with messenger ribonucleic acid in mouse sarcoma 180 ascites cells. Biochem., 11, 792-798
- Mermod, J.J., Schatz, G. y Crippa, M. (1980). Specific control of messenger translation in Drosophila oocytes and embryos. Develop. Biol., 75, 177-186
- Mescher, A. y Humphreys, T. (1974). Activation of maternal mRNA in the absence of poly(A) formation in fertilized sea urchin eggs. Nature, 249, 138-139

- Milcarek, C., Price, R.P. y Penman, S. (1974). The metabolism of a poly(A) minus mRNA fraction in HeLa cells. Cell, 3, 1-10
- Milchev, G.I. y Hadjiolov, A.A. (1978). Association of poly(A) and poly(U) polymerases with cytoplasmic ribosomes. Eur. J. Biochem., 84, 113-121
- Miralles, J., Sebastián, J. y Heredia, C.F. (1978). Independent temporal expression of two N-substituted amino acil-tRNA hydrolases during the development of Artemia salina. Biochem. Biophys. Acta, 518, 326-333
- Modak, M.J. y Srinivasan, P.R. (1973). Purification and properties of a ribonucleic acid primer-independent polyribadenylate polymerase from E. coli. J. Biol. Chem., 248, 6904-6910
- Muthukrishnan, S., Filipowicz, W., Sierran, J.M., Both, G.W., Shatkin, A.J. y Ochoa, S. (1975). mRNA methylation and protein synthesis in extracts from embryos of brine shrimp Artemia salina. J. Biol. Chem., 250, 9336-9341
- Nakanishi, Y.H., Ywasaki, T., Okigaki, T. y Kato, H. (1962). Cytological studies of Artemia salina: I. embryonic development without cell multiplication after the blastula stage in encysted dry eggs. Annot. Zool. Jap., 35, 223-228
- Nevins, J.R. y Joklik, W.K. (1977). Isolation and partial characterization of the poly(A) polymerase from HeLa cells infected with vaccinia virus. J. Biol. Chem., 252, 6939-6947
- Nevins, J.R. y Darnell, J.E. (1978). Steps in the processing of Ad2mRNA: poly(A)⁺ nuclear sequences are conserved and poly(A) addition precedes splicing. Cell, 15, 1477-1493

- Niessing, J. y Sekeris, C.E. (1974). Evidence for the existence of two different poly(A) polymerases and a novel ribohomopolymer polymerase in rat liver nuclei. Biochem. Biophys. Res. Com., 60, 673-680
- Niessing, J. (1975). Three distinct forms of nuclear poly(A) polymerase. Eur. J. Biochem., 59, 127-135
- Nilsson, M.O. y Hultin, T. (1972). Evidence of a stored informational RNA in encysted embryos of Artemia salina. Exp. Cell Res., 72, 145-149
- Nilsson, M.O. y Hultin, T. (1974). Characteristics and intracellular distribution of messenger-like RNA in encysted embryos of Artemia salina. Develop. Biol., 38, 138-149
- Nilsson, M.O. y Hultin, T. (1975). Poly(A) containing cytoplasmic RNA in dormant cysts of Artemia salina. FEBS Letters, 52, 269-272
- Nombela, C., Nombela, M.A., Ochoa, S., Safer, B., Anderson, W.P. y Merrick, W.C. (1975). Polypeptide chain initiation in eukaryotics: mechanism of formation of initiation complex. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 73, 298-301
- Nowak, L., Marvil, D.K., Thomas, J.O., Boublik, M. y Szer, W. (1980). A single-stranded nucleic acid-binding protein from Artemia salina. II. Interaction with nucleic acids. J. Biol. Chem., 255, 6473-6378
- Olalla, A., Renart, J., Sillero, M.A.G. y Sillero A. (1977). Metabolismo de las plaquetas de vitelo durante el desarrollo de la Artemia salina. Avances de la Bioquímica. pg. 111-120. Ed: Cornudella, L., Oro, J., Heredia, C.F. y Sols, A.. Salvat
- Olalla, A., Osuna, C., Sebastián, J., Sillero, A., y Sillero, M.A. (1978). Purification and properties of three proteases from the larvae of the brain shrimp Artemia salina. Biochem. Biophys. Acta, 523, 181-190

- Olson, C.S. y Clegg, J.S. (1978). Cell division during the development of Artemia salina. Wilhelm Roux's Arch: 184, 1-13
- Osuna, C., Olalla, A., Sillero, A., Sillero, M.A. y Sebastián, J. (1977 a). Induction of multiple proteases during the early larval development of Artemia salina. Develop. Biol., 61, 94-103
- Osuna, Renart, J. y Sebastián, J. (1977 b). Proteolytic origin of a modified form of RNA polymerase. I. From Artemia salina larvae. Biochem. Biophys. Res. Com., 78, 1390-1396
- Osuna, C. (1979). Caracterización y regulación del sistema enzimático de transcripción durante el desarrollo de Artemia salina. Tesis Doctoral. Fac. de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid.
- Pascual-Salcedo, D. (1979). Carbamil fosfato sintetasa de E. coli. Purificación, caracterización de una actividad ATPásica y de otros mecanismos de la reacción. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid.
- Pelham, H.P.B. y Jackson, J.R. (1976). An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. Eur. J. Biochem., 67, 247-256
- Pellicer, A., Salas, J. y Salas, M.L. (1975). Poly(A) polymerases in normal and virus transformed cells. Biochem. Biophys. Acta, 378, 107-118
- Penman, S., Rosbash, M. y Penman, M. (1970). Messenger and heterogeneous nuclear RNA in HeLa cells: differential inhibition by cordycepin. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 67, 1878-1885
- Perlman, S. y Rosbash, M. (1978). Analysis of Xenopus laevis ovary and somatic cell polyadenylated RNA by molecular hybridization. Develop. Biol., 63, 197-213

- Perona, R. (1980). Comunicación personal.
- Perry, R.P. y Kelly, D.E. (1973). Messenger RNA turnover in mouse L. cells. J. Mol. Biol., 79, 681-696
- Perry, R.P. y Kelly, D.E. (1974). Existence of methylated messenger RNA in mouse L. cells. Cell, 1, 37-42
- Perry, R.P., Bard, E., Harnes, B.D., Kelley, D.E. y Schibler, U. (1976). The relationship between hnRNA and mRNA. Prog. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol., 19, 275-292
- Pestaña, A., Castro, R., Castell, J.V. y Marco, R. (1978). Fluorometric assays in the study of nucleic acid-proteins interactions. I. The use of Diaminobenzoic acid as a reagent of DNA. Anal. Biochem., 90, 543-550
- Poulson, R. (1978). Isolation, purification and fractionation of RNA. The ribonucleic acids. Ed: P.R. Steward y O.S. Letham. Springer-Verlag. New York-Berlin-Heidelberg
- Preobrazhensky, A.A. y Spirin, A.S. (1978). Informosomes and their protein components: the present state of knowledge. Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol., 21, 1-38
- Raff, R.A. (1979). Masked messenger RNA and the regulation of protein synthesis in eggs and embryos. Cell Biology: A comprehensive treatise. Vol. IV. Ed: Goldstein, L. y Prescott, O.M. Academic Press, New York
- Randerath, K. (1963). Separation of deoxyribonucleotides from ribonucleotides by anion-exchange thin-layer chromatography. Biochem. Biophys. Acta, 76, 622-624
- Randerath, K. y Randerath, E. (1967). Thin-layer separation methods for nucleic acid derivatives. Methods in Enzymology. Vol. XIIa, pg. 323-347. Ed: Colowick, S.P. y Kaplan, N.O. Academic Press, New York and London.

- Reddington, M.A., Fong, A.P. y Tate, W.P. (1978). The termination of the synthesis of proteins in vitro with extracts from the undeveloped cyst of Artemia salina. Develop. Biology, 63, 402-411
- Renart, J. (1975). Desarrollo de la Artemia salina. Aportaciones bioquímicas. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid
- Renart, J. y Sebastián, J. (1976). Characterization and levels of the RNA polymerases during the embryogenesis of Artemia salina. Cell Different., 5, 97-107
- Revel, M. y Groner, Y. (1978). Post-transcriptional and translational controls of gene expression in eukaryotes. Ann. Rev. Biochem., 47, 1079-1126
- Reyes, P. (1972). PEI-cellulose thin-layer chromatography: A highly versatile system for separating purine and pyrimidine nucleotides from nucleosides and free bases. Anal. Biochem., 50, 35-39
- Ro-Choi, T.S., Choi, Y.C., Henning, D., McCloskey, J. y Buch, H. (1975). Nucleotide sequence of U-2 ribonucleic acid. The sequence of the 5' terminal oligonucleotide. J. Biol. Chem., 250, 3921-3928
- Rosbash, H. y Ford, P.D. (1974). Polyadenylic acid containing RNA in Xenopus laevis oocytes. J. Mol. Biol., 85, 87-101
- Rose, K.M., Morris, H.P. y Jacob, S.T. (1975). Mitochondrial poly(A) polymerase from a poorly differentiated hepatoma: Purification and characteristics. Biochemistry, 14, 1025-1032
- Rose, K.M. y Jacob, S.T. (1976). Nuclear poly(A) polymerase from rat liver and hepatoma. Comparison of properties, molecular weights and aminoacid composition. Eur. J. Biochem., 67, 11-21

- Rose, K.M., Roe, P.J. y Jacob, S.T. (1977a). Two functional states of poly(adenylic acid)polymerase in isolated nuclei. Biochem. Biophys. Acta, 478, 180-191
- Rose, K.M., Bell, L.E. y Jacob, S.T. (1977 b). Specific inhibition of chromatin-associated poly(A) synthesis in vitro by cardyacepin 5'-triphosphate. Nature, 267, 178-180
- Rose, K.M. y Jacob, S.T. (1979 a). Phosphorilation of nuclear poly(A) polymerase. Comparison of liver and hepatoma enzymes. J. Biol. Chem., 254, 10256-10261
- Rose, K.M. y Jacob, S.T. (1979 b). Poly(A) polymerase and poly(A) specific mRNA binding protein are antigenically related. Nature, 279, 260-263
- Rosenthal, E.T., Hunt, T. y Ruderman, J.V. (1980). Selective translation mRNA controls the pattern of protein synthesis during early development of the surf clam, Spirula salidissima. Cell, 20, 487-494
- Rottman, F.M. (1978). Methylation and polyadenylation of heterogeneous nuclear and messenger RNA. Biochemistry and nucleic acids: II. Vol. 17, pg. 45-73. Ed: B.F.C. Clark. University Park Press, Baltimore. International Review of Biochemistry.
- Roychoudhury, R. (1972). Enzymic synthesis of polynucleotides. Olygodeoxynucleotides with one 3' terminal ribonucleotide as primers for polydeoxynucleotide synthesis. J. Biol. Chem., 247, 3910-3917
- Roychoudhury, R., Jay, E. y Wu, R. (1976). Terminal labeling and addition of homopolymer tracts to duplex DNA fragments by terminal deoxynucleotidyl transferase. Nucleic. Acid Res., 3, 863-878

- Ruderman, J.V. y Pardue, M.L. (1977). Cell free translation of messenger RNA in echinoderm and amphibian early development. Develop. Biology, 60, 48-68
- Sagata, N., Shiotawa, K. y Yamana, K. (1980). A study on the steady-state population of poly(A)⁺ RNA during early development of Xenopus laevis. Develop. Biol., 77, 431-448
- Sargen, T. y Raff, R.A. (1976). Protein synthesis and messenger RNA stability in activated enucleate sea urchin egg are not affected by actinomycin A. Develop. Biol., 48, 327-335.
- Sastre, L. (1977). Purificación y caracterización de una poly(A) polimerasa en embriones de Artemia salina. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid.
- Sawicki, J.A. y MacIntyre, R.J. (1978). Localization at the ultrastructural level of maternally derived enzyme and determination of the time of paternal gene expression for acid phosphatase - I in Drosophila melanogaster. Develop. Biol., 63, 47-58
- Schibler, U., Marcu, K.B. y Perry, R.P. (1978). The synthesis and processing of the messenger RNAs specifying heavy and light chain Immunoglobulins in MPC-11 cells. Cell, 15, 1495-1509
- Schiller, U. y Perry, R.P. (1976). Characterization of the 5' termini of hrRNA in mouse L cells: Implications for processing and cap formation. Cell, 9, 121-130
- Schmitt, H., Grossfeld, H. y Littauer, U.Z. (1973). Mitochondrial biogenesis during differentiation of Artemia salina cysts. J. Cell Biol., 58, 643-649
- Schorfield, P. y Williams, K.R. (1977). Purification and some properties of E. coli tRNA nucleotidil transferase. J. Biol. Chem., 252, 5584-5588

- Sebastián, J. y Heredia, C.F. (1978). Purification and properties of a ribonuclease induced during the early larval development of Artemia salina. Eur. J. Biochem., 90, 405-411
- Sebastián, J., Cruces, J., Osuna, C., Blanco, E., Sastre, L. y Renart, J. (1980). Papel de las RNA polimerasas en la regulación de la transcripción. I Congreso Hispano-Portugués de Bioquímica, pg. 49
- Serrano, R. (1978). Characterization of the plasma membrane ATPase of Sacharomyces cerevisiae. Mol. Cell Biochem., 25, 51-63
- Sheiness, D., Puckett, L. y Darnell, J.E. (1975). Possible relationship of poly(A) shortening to mRNA turnover. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 1077-1081
- Sierra, J.M., Meier, D. y Ochoa, S. (1974). Effect of development on the translation of messenger RNA in Artemia salina embryos. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71, (7) 2693-2697
- Sierra, J.M., Filipowicz, W. y Ochoa, S. (1976). Messenger RNA in undeveloped and developing Artemia salina embryos. Biochem. Biophys. Res. Com., 69, 181-189
- Simons, J., De Herdt, E., Kondo, M. y Slegers, M. (1978). Membrane associated poly(A) containing ribonucleoprotein in Artemia salina gastrula embryos. FEBS Letters, 91, 53-56
- Slater, D.W., Slater, I. y Gillespie, D. (1972). Post-fertilization synthesis of polyadenylic acid in sea urchin embryos. Nature, 240, 333-337
- Slater, I., Gillespie, D. y Slater, D.W. (1973). Cytoplasmic adenylation and processing of maternal RNA. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70, 406-411

- Slater, I. y Slater, D.W. (1974). Polyadenylation and transcription following fertilization. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71, 1103-1107
- Slater, D.W., Slater, I., Gillespie, D.H. y Gillespie, S. (1974). Post-fertilization polyadenylation during transcriptive and translational inhibition. Biochem. Biophys. Res. Com., 60, 1222-1228
- Slater, D.W., Slater, I. y Bollum, F.J. (1978). Cytoplasmic poly(A) polymerase from sea urchin eggs, merogons and embryos. Develop. Biology, 63, 94-110
- Slegers, H. y Kondo, M. (1977 a). Messenger ribonucleoprotein complexes of cryptobiotic embryos of A. salina. Nucleic. Acid Res., 4, 625-639
- Slegers, H., Mettrie, R. y Kondo, M. (1977 b). Evidence for a cytoplasmic translational inhibitor RNA in Artemia salina gastrula embryos. FEBS Letters, 80, 390-394
- Slegers, H., De Herdt, E., Mettrie, R., Piot, E. y Kondo, M. (1979). Characterization of repressed poly(A) containing ribonucleoprotein in cryptobiotic gastrulae of Artemia salina. Biochemistry of Artemia Development. Ed.: Bagshaw, J.C. y Warner, A.H. University Microfilms International.
- Smith, J.D. (1967). Paper electrophoresis of nucleic acid components. Methods in Enzymology, 12a, 350-361
- Soreq, H., Nudel, V., Salomon, R., Revel, M. y Littauer, U.Z. (1974). In vitro translation of polyadenylic acid-free rabbit globin messenger RNA. J. Mol. Biol., 88, 233-245
- Spiegel, S. y Marcus, A. (1975). Polyribosome formation in early wheat embryo germination independent of either transcription or polyadenylation. Nature, 256, 228-230

- Strain, R.K., Skoultchi, A.I. y Shafritz, O.A. (1977). A characterization of globin mRNA sequences in the nucleus of duck immature red blood cells. Cell, 12, 133-141
- Sullivan, N. y Roberts, W.K. (1973). Characterization and poly (adenylic acid) content of Ehrlich ascites cells ribonucleic acids fractionated on unmodified cellulose column. Biochemistry, 12, 2395-2403
- Susheela, C. y Jayaraman, K. (1976). On the mode of activation of sequestered messengers in Artemia salina. Differentiation, 5, 29-33
- Tsiapalis, C.M., Dorson, J.W. y Bollum, F.J. (1975). Purification of terminal riboadenylate transferase from calf thymus gland. J. Biol. Chem., 250, 4486-4496
- Vallejo, C.G., Günther, M.A. y Marco, R. (1979). Mitochondrial maturation during Artemia salina embryogenesis. General description of the process. Cell. Mol. Biology, 25, 113-124
- Venrooij, W.J., Fekelen, C.A.G., Jansen, R.T.P. y Princen, J.M.G. (1977). Specific poly(A) binding protein of 76.000 M.W. in polyribosomes is not present on poly(A) of free cytoplasmic mRNP. Nature, 270, 189-191
- Vournakis, J.N., Gelinas, R.E. y Kafatas, F.C. (1974). Short polyadenylic acid sequences in insect chori on messenger RNA. Cell, 3, 265-274
- Walbot, V., Capdevila, A. y Dure III, L.S. (1974). Action of 3' dAdenosine (cordycepin) and 3' dCeytidine on the translation of the stored mRNA of the cotton cotyledons. Biochem. Biophys. Res. Com., 60, 103-110
- Weinberg, R.A. (1973). Nuclear RNA metabolism. Ann. Rev. Biochem., 42, 329-354

- Wilkie, N.M. y Senellie, R.M.S. (1968). Chain extension of ribonucleic acid by enzymes from rat liver cytoplasm. Biochem. J., 109, 485-495
- Williamson, R., Crossley, J. y Humphries, S. (1974). Translation of mouse globin messenger ribonucleic acid from which the poly(adenylic acid) sequence has been removed. Biochemistry, 13, 703-707
- Wilt, F.H. (1973). Polyadenylation of maternal RNA of sea urchin eggs after fertilization. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70, 2345-2349
- Wilt, F.H. (1977). The dynamics of maternal poly(A) containing mRNA in fertilized sea urchin eggs. Cell, 11, 673-681
- Winters, M.A. y Edmonds, M. (1973 a). A poly(A) polymerase from calf thymus. Purification and properties of the enzyme. J. Biol. Chem., 248, 4756-4762
- Winters, M.A. y Edmonds, M. (1973 b). A poly(A) polymerase from calf thymus. Characterization of the reaction product and primer requirements. J. Biol. Chem., 248, 4763-4768
- Woodland, H.R., Flynn, J.M. y Wyllie, A.J. (1979). Utilization of stored mRNA in *Xenopus* embryos and its replacement by newly synthesized transcripts histone H1 synthesis using interspecies hybrids. Cell, 18, 165-171
- Wu, R.S. y Wilt, F.H. (1974). The synthesis and degradation of RNA containing polyriboadenylate during sea urchin embryogenesis Develop. Biol., 41, 352-370