

Tesis de Posgrado

Mecanismos de replicación del ácido deoxiribonucleico : ADN polimerasas en linfocitos humanos

Strusberg, Sylvia Teresa

1977

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Strusberg, Sylvia Teresa. (1977). Mecanismos de replicación del ácido deoxiribonucleico : ADN polimerasas en linfocitos humanos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1530_Strusberg.pdf

Cita tipo Chicago:

Strusberg, Sylvia Teresa. "Mecanismos de replicación del ácido deoxiribonucleico : ADN polimerasas en linfocitos humanos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1977. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1530_Strusberg.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

MECANISMOS DE REPLICACIÓN DEL ÁCIDO DEOXIRIBONUCLEICO

ADN POLIMERASAS EN LINFOCITOS HUMANOS

Sylvia Teresa Strusberg

Tesis de Doctorado

1977

Consejero de Tesis: Dr. José Mordoh

**Lugar de Trabajo: Instituto de Investigaciones Bioquímicas
"Fundación Campomar", Buenos Aires.**

103

AGRADECIMIENTOS

A los Dres. José Mordoh y Bertold Fridlender, cuyas enseñanzas hicieron posible esta tesis.

A Susana Blau, compañera de equipo.

Al Dr. Luis F. Leloir, por haberme permitido realizar este trabajo en el Instituto por él dirigido.

ABREVIATURAS UTILIZADAS

ADN:	ácido deoxiribonucleico.
ARN:	ácido ribonucleico.
dATP:	deoxiadenosina trifosfato.
dCTP:	deoxicitidina trifosfato.
dGTP:	deoxiguanosina trifosfato.
dTTP:	deoxitimidina trifosfato.
dT:	timidina.
ATP:	adenosina trifosfato.
AMP:	adenosina monofosfato.
poli (A):	ácido poliadenílico.
poli (C):	ácido policitidílico.
poli (U):	ácido poliuridílico.
poli (I):	ácido polinosínico.
PHA:	fitohemoaglutinina.
Con-A:	concanavalina A.
PWM:	pokeweed mitógenos.
AD:	alcohol dehidrogenasa.
AP:	fosfatasa alcalina.
BD:	blue dextran.

SAB: Albúmina de suero bovino.
Pe: peroxidasa.
C: citocromo C.
PCA: ácido perclórico.
DIT: ditioneitol.

ÍNDICE

ABREVIATURAS:	3
RESUMEN:	6
INTRODUCCIÓN:	7
OBJETO DEL TRABAJO:	53
MATERIALES Y MÉTODOS:	55
RESULTADOS:	62
DISCUSIÓN:	102
BIBLIOGRAFÍA:	112

RESUMEN

Se describe la presencia, distribución y algunas propiedades de las ADN polimerasas aisladas de linfocitos humanos de sangre periférica normal sin estimular y estimulados por fitohemoaglutinina.

En los linfocitos no estimulados se encuentran dos ADN polimerasas citoplasmáticas que eluyen de columnas de DEAE celulosa a 0,07M de ClNa (C_{IN}) y a 0,13M de ClNa (C_{IIN}). En la fracción nuclear se encuentra una sola enzima (N_{IN}) que no se adsorbe a la DEAE celulosa.

En el caso de linfocitos estimulados se detecta una sola enzima citoplasmática que eluye a 0,12M de ClNa. La fracción nuclear contiene dos actividades enzimáticas, la correspondiente a N_{Is} que no se adsorbe a la DEAE celulosa y la N_{IIs} que eluye de la DEAE celulosa a 0,07M de ClNa.

INTRODUCCIÓN

Rol de los ácidos nucleicos

Una de las características más sorprendentes de la célula viviente es su capacidad para transmitir las propiedades de una generación celular a otra. Si bien la existencia de la herencia había sido notada por el hombre en la antigüedad sus bases químicas y físicas no fueron entendidas hasta principios del siglo veinte.

La evidencia de que los ácidos nucleicos actúan en la transmisión de la herencia proviene de tres clases de experimentos, hechos con bacterias y virus.

El primero fue el trabajo de Avery y sus colegas McLeod y McCarty, quienes encontraron en 1944 que las propiedades hereditarias de las bacterias pneumonia podían ser alteradas específicamente por el agregado de ADN de alto peso molecular, siendo esta habilidad del ADN totalmente destruída por la enzima deoxiribonucleasa.

El segundo tipo de experimentos estaba relacionado al problema de cómo los bacteriófagos virulentos afectan a su huésped. Hershey y Chase en 1952 marcaron la proteína del fago T_2 con S^{35} y el ADN con P^{32} , demostrando que sólo el ADN es el responsable de programar la producción de proteínas y ADN de nuevos fagos.

El tercer experimento fue realizado por Fraenkel-Conrat y Singer en 1957. Ellos establecieron que en el caso de los virus de plantas, bacterias y animales que consisten sólo de ARN y proteína, el ARN suplanta al ADN como material genético.

Estructura Físico-Química del ADN

La degradación hidrolítica del ADN por ácidos o enzimas permitió conocer sus tres componentes esenciales. Éstos son: 2-deoxy-D-ribosa, ácido fosfórico y bases nitrogenadas.

El ADN de todos los tipos de células contiene dos clases de bases nitrogenadas: las purinas, adenina y guanina y las pirimidinas, timina y citosina.

Muchos investigadores intentaron explicar la estructura completa del ADN pero ésta fue formulada recién en 1953 por Watson y Crick. Ellos sintetizaron brillantemente los datos químicos y de difracción de rayos X en una estructura simétrica que poseía las propiedades inherentes a todo material genético. El modelo de Watson y Crick (1) comprende dos cadenas de polinucleótidos que se entrelazan para formar una doble hélice. Las dos cadenas están unidas por puentes de hidrógeno entre las bases.

Pero la característica más interesante del modelo es que necesita apareamientos específicos entre las bases: la adenina se aparea siempre con timina y la guanina con citosina. La rigidez de estas reglas de apareamiento lleva a una relación complementaria entre las secuencias de bases de las dos cadenas. Debido a esta complementariedad la estructura de Watson y Crick se adapta idealmente a un

modelo de replicación en sí mismo, ya que cuando cada cadena se separa de la otra puede actuar como templado para la síntesis de una nueva cadena, dando así lugar a dos hélices idénticas a las anteriores.

Replicación del ADN en bacterias

Debido a la complejidad de las células de eucariotes y a sus complicados mecanismos de regulación, la mayor parte de las investigaciones realizadas hasta ahora para dilucidar el mecanismo de la replicación del ADN se han hecho en bacterias, aunque las investigaciones en células de organismos superiores han avanzado rápidamente en los últimos años.

Se sabe que la replicación del cromosoma en bacterias abarca dos grandes procesos: la iniciación de la síntesis del ADN y la elongación cromosómica, siendo el primero de ellos la etapa regulatoria.

Entre los organismos inferiores, *Escherichia Coli* ofreció la ventaja de la gran información genética existente, siendo además sus caminos metabólicos bastante conocidos.

Estudios bioquímicos y genéticos sugirieron que en *E. Coli* ocurrían los siguientes sucesos durante la elongación de su cromosoma (2-3-4-5-6-7-8):

- a) El desenrollamiento de las cadenas parentales.
- b) La síntesis de fragmentos iniciadores de ARN por la ARN polimerasa ADN dependiente.
- c) La extensión de los iniciadores por una ADN polimerasa, for-

mando los llamados segmentos de Okazaki. (Estos son fragmentos compuestos de una pequeña parte de ARN unida a ADN).

- d) La remoción del ARN por la RNasa H.
- e) El llenado de los intervalos vacíos.
- f) La unión covalente de los fragmentos de ADN por una ligasa.

ADN polimerasas en procariotes

En *E. Coli* se conocen tres polimerasas. La polimerasa I, aislada por Kornberg (9) en 1956, fue la primera enzima relacionada a la síntesis de polideoxinucleótidos. La ADN polimerasa II fue aislada simultáneamente por Kornberg y Gefter (10) y por Knippers (11). Por último la ADN polimerasa III fue encontrada por Kornberg y Gefter (12-13-14).

Existe una clase importante de mutaciones condicionales en bacterias y fagos que permite a éstos multiplicarse a 30°C, aunque no a 42°C. En *E. Coli* el uso de mutantes termosensibles afectadas en los distintos procesos que involucran la replicación del ADN y la división celular mostró ser una muy buena herramienta para el análisis de estos procesos.

La evidencia de que distintas polimerasas realizan distintas funciones proviene del estudio de estas mutantes. El hallazgo hecho por De Lucia y Cairns (15) de que una mutante de *E. Coli* deficiente en la ADN polimerasa I es capaz de crecer normalmente sugirió que esta enzima solamente repara el ADN. Por otro lado, experimentos hechos con una mutante termosensible de *E. Coli* para la ADN polimerasa III, llevó a la conclusión de que esta enzima es la responsable

de la replicación en esa especie.

Wickner (16) y otros, estudiando la conversión enzimática de ADN circular de una sola cadena de los virus M13 y Φ X174 a su forma replicativa de duplex revelaron una nueva forma de ADN pol III conocida como ADN pol III* y que sería la enzima responsable de esta replicación.

Replicación del ADN en células eucariotes

Debido a que no hay todavía mutantes de replicación de ADN en células eucariotes, la investigación de la síntesis del ADN y su control en organismos superiores requiere un sistema que permita no sólo el estudio de diferentes enzimas, sino también correlacionar actividades bioquímicas con funciones celulares.

Poco se conoce todavía sobre la replicación del ADN en células de organismos superiores. La mayor parte de las investigaciones se han realizado en sistemas subcelulares aislados, como en el caso del núcleo.

Por estudios de radioautografía, Hubberman y Riggs (17-18), observaron que el ADN de células de eucariotes se replica teniendo una estructura con puntos de crecimiento en forma de tenedor.

Ellos mostraron que:

- a) Durante la fase S de células de mamíferos en cultivo la replicación del ADN se produce en unidades que están distribuidas en tandem.
- b) Desde cualquier punto de iniciación u origen, la replicación progresa bidireccionalmente (por medio de dos tenedores di-

vergentes), con una velocidad de aproximadamente $0.5-1.2 \mu\text{m}/\text{min}$.

- c) Los intervalos entre orígenes varía entre 15 y 120 μm .
- d) La replicación puede comenzar desde orígenes vecinos en forma escalonada en el tiempo.

Por otro lado, estudios hechos sobre los cromosomas en estado mitótico de células enteras de varios organismos indicaron que existen concurrentemente varios sitios de replicación del ADN. Esto se demostró dando pulsos de timidina tritiada durante la fase S precedente (19).

Después del descubrimiento de los segmentos de Okazaki en procariones muchos investigadores han tratado de detectarlos en células de mamíferos y en algunos casos con resultados positivos.

Según Huberman y Horowitz (20) estos segmentos existen, pero la posibilidad de encontrarlos depende de los métodos de preparación. Las investigaciones hechas hasta el momento sugieren que en células de eucariotes existen unidades de replicación y que la síntesis de ADN es discontinua, procediendo en pasos que involucran la formación de pequeñas piezas que luego se unen para formar el cromosoma completo (21-22-23).

En forma análoga a los descubrimientos de Okazaki en *E. Coli*, en eucariotes también estos segmentos se iniciarían con un fragmento de ARN. Esto fue demostrado por varios investigadores (24-25). Pigiet, Eliasson y Reichard llegaron a esta conclusión usando núcleos aislados de cultivos de células de fibroblastos de ratón infectados con poliovirus.

Estos autores proponen que la replicación del ADN en eucariotes se llevaría a cabo por un mecanismo semejante a la replicación en procariotes, es decir por:

- a) Iniciación de nuevos fragmentos por una ARN polimerasa.
- b) Extensión de la cadena por una ADN polimerasa.
- c) Remoción del segmento de ARN por la RNasa H.
- d) Llenado de los lugares vacíos por una ADN polimerasa.
- e) Unión de los intermediarios por una ADN ligasa.

Taylor (21) y colaboradores observaron que los segmentos de Okazaki estarían unidos a secuencias de nucleótidos que podrían servir como sitios de iniciación para el crecimiento del ADN.

Estructura del cromosoma de eucariotes

Investigaciones morfológicas y químicas de los cromosomas de los organismos superiores revelaron que están compuestos de complicadas estructuras nucleoproteicas, formando ovillos cuyas fibras tienen un espesor de $200 \overset{\circ}{\text{Å}}$ cada una.

El ADN de los cromosomas está asociado a ciertas proteínas básicas, las protaminas y las histonas, que se enrollan alrededor de la doble hélice. Otras proteínas se combinan periódicamente con esas proteínas básicas y con los grupos fosfato del esqueleto del ADN y probablemente son responsables por las alteraciones tintóreas de los cromosomas durante el ciclo celular (27). También se encontraron ADN y ARN polimerasas unidas al núcleo y al ADN.

No es claro cual es la disposición de las histonas en el cromosoma, pero aparentemente dos moléculas de ADN se unen lado a lado

por medio de proteínas para formar una fibra.

El Ca^{++} y el Mg^{++} jugarían un rol importante (28) en la estructura del cromosoma. Esto fue propuesto por varios investigadores que observaron el efecto ejercido por agentes quelantes.

En los organismos superiores el plegamiento y condensación de la molécula de ADN aparentemente continua, en un único cromosoma, hace difícil entender la replicación a nivel celular.

Aunque la estructura del cromosoma sufre cambios complejos y cíclicos durante la mitosis, la meiosis y la espermiogénesis, en todos los casos la unidad básica es la molécula nucleoproteica macromolecular y filamentosa. Si bien la mayoría de los investigadores (19) apoyaron la idea de una única pieza de ADN duplex por cromosoma, algunas otras observaciones introdujeron dudas al respecto. Sólo recientemente, midiendo las propiedades viscoelásticas del ADN de los cromosomas de *Drosófila*, se ha podido mantener este largo polímero en solución y efectuar así las mediciones (21).

En células de organismos superiores se cree ahora que el ADN cromosomal está constituido por subunidades funcionales. Las más pequeñas son los segmentos de Okazaki, de alrededor de 1.200 nucleótidos que corresponden a $0.4 \mu\text{m}$ de ADN helicoidal y las mayores tienen $2 \mu\text{m}$ y contienen por lo tanto aproximadamente 6.000 nucleótidos.

La iniciación, por lo menos en algunos sitios, se debe a porciones de ARN, las cuales están unidas a los fragmentos de ADN naciente.

De acuerdo con Davidson, en el cromosoma existen segmentos de alrededor de 9.000 nucleótidos que están separados por secuencias

repetidas de aproximadamente 300 nucleótidos.

Taylor y colaboradores (21) mostraron que las secuencias del ARN que sirve como iniciadores en los segmentos de Okazaki son complementarias a una parte de estas regiones repetidas.

Síntesis de ADN y ciclo celular

En células eucariotes el ciclo celular consta de dos partes fundamentales (29-30): la interfase y la división.

a) La interfase: es un largo período de crecimiento que a su vez puede subdividirse en varias etapas: G_1 , S y G_2 .

Después del período G_1 , en el cual se sintetizan los constituyentes necesarios para la duplicación del ADN y otras sustancias celulares, comienza el período S, en el cual se replica el material genético. Ya completada la duplicación del ADN, la célula entra en la etapa final de la interfase, período G_2 en la cual culminan los preparativos para la división.

La duración de los distintos estados en células diferentes varía, pero esta variación es pequeña entre células de una misma especie. Los cambios mayores se encuentran en G_1 , siendo G_2 y S bastante constantes. En la mayoría de las células de mamíferos la fase S tarda de 6 a 8 horas y la fase G_2 de 3 a 5 horas. La fase G_1 sin embargo puede tardar desde unas pocas horas a varios días.

b) La división o mitosis: es un período relativamente corto respecto a la interfase por medio del cual se producen dos cé-

lulas hijas.

Este ciclo se repite en cada generación celular. Bajo condiciones de temperatura y nutrición determinadas es constante para cada tipo de célula. En la mayoría de las plantas y animales el ciclo entero tiene una duración de alrededor de veinte horas, de las cuales sólo una corresponde a la división celular y el resto a la interfase.

Síntesis de ADN en núcleo aislado

Debido a la complejidad de los organismos superiores es difícil estudiar los mecanismos de replicación del ADN in vivo. Es por ello que la mayor parte de las investigaciones se han realizado en núcleos aislados.

Aunque es muy complicado determinar el efecto del procedimiento de aislamiento sobre la capacidad del núcleo para sintetizar ADN, dado que la cantidad de proteínas nucleares que se pierde es desconocida, en general esos experimentos dan amplia justificación para trabajar con núcleos aislados como método para delinear los mecanismos de síntesis de ADN (31).

En estudios con células sincronizadas se comprobó que la replicación de ADN en núcleos de mamíferos es un proceso muy ordenado que necesita a un tiempo determinado síntesis de ARN y proteínas.

Los requerimientos para la síntesis de ADN en núcleos aislados fueron ya descriptos en los primeros estudios sobre el tema (32). Se sabía que el núcleo necesitaba los cuatro deoxiribonucleósidos trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) un iniciador de ADN y Mg^{++} (33). La velocidad de síntesis en núcleos aislados era muy pequeña compa-

rada con la velocidad in vivo. Este hecho fue atribuido a los efectos producidos por los procedimientos de aislamiento.

La cromatina endógena puede actuar como iniciador y templado para la polimerasa nuclear (34). Probst y otros mostraron que sus preparaciones nucleares sintetizaban ADN cuando se les agregaba los cuatro deoxinucleósidos trifosfatos, Mg^{++} y un exceso de ATP sin necesidad de iniciador. Pero la mayoría de esos investigadores notaron que la síntesis de ADN se incrementa significativamente si se agrega un iniciador apropiado.

Existe evidencia (35) que la cromatina nuclear puede ser un factor limitante de la síntesis de ADN in vitro debido a su ineficiente capacidad como iniciador. Burgoyne (36-37) y colaboradores demostraron usando hígado y timo de ratón que existe una endonucleasa que es dependiente del ión Ca^{++} , que crea rupturas en el ADN del núcleo estimulando la síntesis del ADN.

Lynch (33) y otros mostraron que el tratamiento de núcleos normales con DNAsa pancreática aumenta la síntesis de ADN y este efecto es parecido al producido por la exonucleasa III sobre cromatina de esperma (38).

Varios investigadores encontraron que sus preparaciones nucleares necesitan ATP para obtener una máxima actividad de la ADN polimerasa, aunque no se conoce todavía el rol del ATP.

Se han hecho muchos estudios para determinar si el proceso de síntesis de ADN y el producto formado en núcleos aislados se parece al de la célula entera.

Friedman y Mueller (31-39) encontraron que núcleos aislados de

células HeLa en fase S, aparentemente continúan in vitro la síntesis comenzada in vivo. El producto de la reacción in vitro es sensible a la DNasa y su densidad y perfil de sedimentación similares al ADN extraído de núcleos de células HeLa.

Kidwell y Mueller (40) mostraron que el ADN hecho in vitro por núcleos aislados se sintetiza en forma discontinua, de manera semejante a lo que ocurre in vivo.

Schandle y Taylor (41) dieron pulsos de timidina marcada a núcleos aislados produciendo cortos segmentos de ADN radioactivos que eran convertidos a unidades mayores por la adición de ATP, seguramente por la acción de una ligasa.

Otros investigadores llegaron a la conclusión que la síntesis de ADN en sus fracciones nucleares era una continuación de la replicación in vivo y que la habilidad del núcleo para replicar el ADN in vitro dependía que la célula intacta hubiera estado sintetizando ADN.

Waqar (42) y otros investigadores lograron que núcleos aislados de hígado y timo de ratón replicaran su ADN sin el agregado de iniciador exógeno. Luego estudiaron por medio de análisis químico la secuencia del ADN producido, obteniendo una composición muy similar a la que observaron al analizar directamente ADN de hígado de ratón obtenido a partir de célula entera. Esto sugirió que la ADN polimerasa usa como templado para la replicación su ADN celular.

También existe evidencia de reparación (33) del ADN en núcleos aislados de hígado de ratón.

Estas y otras propiedades del núcleo sugieren que estos funcio-

nan in vitro como lo hacen in vivo. Así también, núcleos aislados parecen responder a mecanismos de control celular para la síntesis de ADN.

Esto fue demostrado por Thompson y Mc Carthy (43-44) que encontraron un factor citoplasmático soluble de células que están replicando activamente su ADN y que es capaz de estimular diez a veinte veces núcleos de células que no sintetizan ADN in vitro, como es el caso de hígado de ratón y eritrocitos de pollo. En esos experimentos no hubo agregado de iniciador exógeno, de tal forma de permitir al núcleo, en presencia de Mg^{++} y los cuatro deoxinucleósidos tri-fosfatos, usar la cromatina endógena.

Esos resultados son similares a los obtenidos por otros investigadores utilizando núcleos de células HeLa sincronizadas y fracciones citoplasmáticas de distintas fases del ciclo celular.

Control de la replicación del ADN

Hay evidencias contradictorias sobre el control de la replicación del ADN en células eucariotes.

En algunos sistemas la simple presencia o ausencia de ADN polimerasa puede ser uno de los factores primarios del control de la síntesis de ADN.

Cuando se estimula linfocitos con fitohemoaglutinina (45) pasa un tiempo antes de que las células se dividan. Durante este tiempo las células deben sintetizar la ADN polimerasa, existiendo una excelente correlación entre la velocidad de síntesis del ADN y la cantidad de polimerasa.

En otros casos la síntesis de ADN parece independiente del nivel de la ADN polimerasa. Por ejemplo: hígado de ratón en regeneración. En este caso (48) la replicación del ADN cesa naturalmente pero el nivel de ADN polimerasa se mantiene alto.

El control de la replicación en embriones de erizo de mar (46-47) es también independiente de la síntesis de nueva enzima, persistiendo una alta actividad enzimática desde el huevo hasta el estado de blástula. Aquí el control parece involucrar una transferencia de la enzima del citoplasma al núcleo, posiblemente por la disponibilidad de nuevos sitios enzimáticos sobre la cromatina nuclear.

ADN polimerasas de células eucariotes

En mamíferos se han aislado varias especies moleculares de ADN polimerasas de citoplasma, núcleo y mitocondria, en distintos estados de desarrollo o diferenciación, aunque todavía no se sabe cual es la enzima responsable de la replicación cromosómica.

Este problema se ha complicado aún más con el descubrimiento por Temin y Mizutani en 1970 (49), de una ADN polimerasa que es dependiente de ARN de virus y que se ha encontrado en células leucémicas y en algunos tumores (50).

En la mayoría de las células de eucariotes se han encontrado dos enzimas que se diferencian por sus pesos moleculares, ubicación celular y otras propiedades y que según la nomenclatura establecida (51) actualmente se las denomina ADN polimerasa α y ADN polimerasa β . También existe otra ADN polimerasa encontrada en muchas células animales conocida por ADN polimerasa γ , a la que anterior-

mente se denominaba R-ADN polimerasa. Esta enzima cataliza la síntesis de poli (dT), usando como templado poli (rA). Por último está la ADN polimerasa mitocondrial designada: ADN polimerasa mt.

Propiedades de las ADN polimerasas

ADN polimerasa α

Es la enzima cuya actividad aumenta en células en crecimiento. Esta enzima, de alto PM ($1.1-2.2 \times 10^5$ daltons) y coeficiente de sedimentación 5-8s, se encuentra predominantemente en el citoplasma aunque también se encuentra en el núcleo (51). Forma agregados a baja fuerza iónica, y copia muy bien duplex de ADN con cortes que contienen grupos 3'OH libres (52). Es muy sensible a los inhibidores de grupos sulfhidrilos. Tiene un pH óptimo cerca de la neutralidad, cuando se usa como iniciador-templado ADN activado.

Esta enzima es inhibida por altas concentraciones de actinomicina D y baja concentración de hem y bromuro de etilo. También es inhibida por α neomicina, ácido poliuridílico, nitrosoureas, isocianatos, 5-trifluor-metil-2'deoxiuridina-5'trifosfato, arabinofuranosil citosina trifosfato y derivados de la rifampicina.

Por los métodos de aislamiento usados hasta ahora, esta enzima no está asociada a ninguna actividad de nucleasa, ni cataliza intercambios de pirofosfato con los deoxinucleósidos trifosfatos (52-53).

ADN polimerasa β

Es una enzima de bajo PM ($4-5 \times 10^4$ daltons) con un coeficiente de sedimentación de 3-4s (51-54). Se encuentra en el núcleo y a baja fuerza iónica puede existir como agregados. Esta enzima copia efi-

cientemente duplex de ADN con cortes y a una velocidad menor puede reproducir la parte de ribohomopolímero de complejos como $(A)_n dT_{15}$.

Es insensible a inhibidores de grupos sulfhidrilos (56). Tiene un pH óptimo alcalino cuando se usa ADN activado como iniciador-templado.

La enzima purificada no tiene actividad de nucleasa ni cataliza intercambio de pirofosfato. Y aunque requiere los cuatro deoxinucleósidos tri-fosfatos para su máxima actividad, puede ser significativamente activa con sólo uno, dos o tres nucleótidos en presencia de ADN activado como templado.

ADN polimerasa γ

Representa sólo 1-2% de la actividad total de la ADN polimerasa celular y está presente en el núcleo y citoplasma (51-57).

En células HeLa se encontró que la polimerasa γ tiene dos componentes, I y II. El PM de ambos es 110.000 daltons y difieren en su capacidad para leer varios ribohomopolímeros tales como poli (I), poli (C) o poli (U). La forma I (58) copia bien poli (A) y pobremente los homopolímeros poli (C), poli (I) o poli (U) mientras que la forma II copia bien todos los homopolímeros.

Estas dos formas enzimáticas, separables por columnas de hidroxapatita, se comportan también en forma distinta en presencia de sal o etanol y ninguna de las dos es inhibida por el antisuero que inhibe la transcriptasa inversa de virus de tumores de primates y ratones.

Esta última propiedad, junto al hecho de que esta enzima no copia ARN, la diferencia de la ADN polimerasa ARN dependiente de los

virus oncogénicos a ARN.

Por otro lado, la ADN polimerasa δ se diferencia fácilmente de las otras ADN polimerasas dependientes de ADN por su capacidad en copiar ribohomopolímeros como $(A)_n dT_{15}$ a mucho mayor velocidad que el ADN activado. Requiere grupos sulfhidrilos para su máxima actividad.

ADN polimerasa mt

Encontrada en las mitocondrias, tiene un peso molecular de alrededor de 1.5×10^5 daltons (51-59). Las preparaciones de que se disponen contienen actividad de endonucleasa y son capaces de copiar ADN duplex a una velocidad significativa, lo cual las diferencia de las otras polimerasas celulares.

Fisiología y función de las ADN polimerasas

ADN polimerasa α y ADN polimerasa β

Bellair (60) e Iwamura (61) y también Ove (62-63) y colaboradores separaron las dos polimerasas de extractos crudos de células de hígado de ratón por cromatografía, usando filtración por geles. Ellos observaron que ambas enzimas requerían los cuatro deoxiribonucleósidos-trifosfatos y Mg^{++} , pero se diferenciaban en cuanto a su preferencia por iniciador. Mientras que la ADN pol α prefería ADN desnaturalizado de bajo PM, la ADN pol β utilizaba mejor el ADN nativo.

Baril (64-65) y otros investigadores encontraron que la ADN pol β estaba asociada a los fragmentos de membrana del sobrenadante post-microsomal.

Chiu y Sung (66-67) describieron dos ADN polimerasas de cerebro de ratón en desarrollo similares a las enzimas de hígado de ratón.

Adams (68) y otros trabajando con cultivos de células L de ratón, encontraron dos actividades de ADN polimerasa en la fracción nuclear. Una de ellas prefiere ADN nativo como iniciador y se encuentra firmemente unida dentro del núcleo. Los PM obtenidos para esta enzima son de 3.5×10^4 , 7×10^4 y 1.4×10^5 daltons, lo que sugiere que se agrega para formar dímeros y tetrámeros.

La otra enzima se encuentra además en el sobrenadante y muestra mayor actividad con ADN desnaturalizado. Tiene un PM aproximado de 2.5×10^5 daltons. Esta enzima se encuentra más firmemente unida al núcleo durante la fase S del ciclo celular, lo que es consistente con la idea de una translocación de las especies de alto PM desde el citoplasma al núcleo en células de mamíferos como ocurre en el caso de embriones de erizo de mar.

Wicha y Stockdale (69) encontraron dos ADN polimerasas en células embrionarias de músculo antes de su diferenciación. Una de estas enzimas, la ADN pol β de bajo PM es predominantemente nuclear y prefiere ADN nativo como iniciador. La ADN pol α de alto PM, proviene de la fracción citoplasmática y prefiere ADN desnaturalizado o con cortes.

Weissbach y colaboradores (56) describieron dos ADN polimerasas en núcleo de células humanas en cultivo, una más grande y otra más pequeña. Además hallaron una enzima citoplasmática similar a la de mayor tamaño encontrada en núcleo.

Una distribución enzimática parecida se describió en un culti-

vo de células KB (70).

Craig y Keir (71) purificaron y caracterizaron la ADN pol α y ADN pol β de células BHK y encontraron que estas enzimas diferían marcadamente en su pH óptimo, en la inhibición por N-etilmaleimida y en la capacidad de usar algunos templados sintéticos. También estudiaron la distribución subcelular de estas enzimas y la heterogeneidad de la ADN pol α (72-73).

Lazarus y Kitron (74) aislaron ADN polimerasas citoplasmáticas de células BHK que tenían un alto peso molecular (entre 1.5×10^5 y 2×10^5 daltons) y concluyeron que eran formas poliméricas de un monómero de 5.4×10^4 daltons, cuyas propiedades eran parecidas (coeficiente de sedimentación, especificidad de templado, resistencia a la inhibición por N-etilmaleimida y heparina) a las de la ADN polimerasa nuclear (75-76).

Por otro lado, Hecht observó un fenómeno similar con la ADN polimerasa citoplasmática de testículo de ratón. Él distinguió en este tejido tres polimerasas: una nuclear (3-5 s), otra citoplasmática (6-8 s) a baja fuerza iónica y una mitocondrial (9-10 s). Encontró que la mayoría de la actividad (6-8 s) citoplasmática era convertida por sal a una forma que sedimenta a (3.5 s). A partir de esos resultados, Hecht postuló la hipótesis de que la enzima nuclear es la responsable de la replicación y que la enzima citoplasmática resulta de una modificación de la nuclear. Estos cambios ayudarían a regular la cantidad de enzima nuclear. Por otro lado el movimiento de la enzima citoplasmática al núcleo requeriría la conversión de la forma (6-8 s) a la forma (3-5 s).

Sin embargo recientes estudios (55) mostraron que la ADN polimerasa β es propensa a formar agregados, lo que llevó a dudar seriamente de las conclusiones alcanzadas por Hecht, Lazarus y Kitron.

Brun (77) y colaboradores purificaron las polimerasas de embriones de pollo y encontraron básicamente dos polimerasas: una de ellas de alto PM, que es citoplasmática y otra de bajo PM que se encuentra tanto en núcleo como citoplasma. La enzima de bajo PM se encuentra en dos formas: la citoplasmática con un PM de 2.7×10^4 daltons y la nuclear con un PM de 5×10^4 daltons.

Estas dos formas poliméricas tienen idénticas propiedades catalíticas y ellos sugieren que esta enzima actuaría reparando el ADN. En cambio la enzima citoplasmática de alto PM estaría involucrada en la replicación del ADN.

Estos resultados fueron sugeridos por estudios de especificidad usando distintos iniciadores.

Existen otros estudios donde no se encuentran necesariamente esas dos enzimas. Por ejemplo (78), Momparler y colaboradores observaron dos enzimas de alto PM, aunque no está establecido aún si alguna de ellas está asociada con el núcleo. Estas enzimas tienen PM estimados por gradientes de glicerol de 2×10^5 y 1.5×10^5 daltons.

Cuando se compara las actividades de las polimerasas en células que están en activa replicación se encuentra que fundamentalmente es la ADN pol α que aumenta o está ya presente en mayores cantidades.

En hígado de ratón (60-61-62-63); Bellair, Iwamura y Ove y colaboradores observaron que la ADN pol α aumentaba su actividad cuan-

do se inducía la regeneración del hígado por hepatectomía parcial. Y también era ésta enzima que mostraba mayor actividad en hígado fetal de ratón, mientras que la actividad de la ADN pol β queda prácticamente constante en todos los casos.

Baril (64) y otros investigadores observaron una situación similar en hígado de ratón en regeneración.

Chang y Bollum (79) usaron gradientes de sacarosa para determinar las relaciones entre las dos polimerasas de hígado de ratón, durante el proceso de regeneración hepática. En este período, la actividad de la ADN polimerasa α aumenta, mientras el nivel de la ADN polimerasa β queda casi constante; y éste mismo fenómeno fue observado por Chang (80) y colaboradores usando células L de ratón. Cuando a esas células se las cultiva hasta la fase estacionaria la síntesis de ADN y la división celular se para y la actividad de la ADN pol α disminuye en forma notable.

Si a las células se las estimula diluyéndolas en medio fresco la síntesis de ADN aumenta nuevamente al igual que la actividad de la enzima.

Chiu y Sung (81) relacionaron las actividades de la ADN pol α y la ADN pol β de cerebro de ratón en distintos estados de desarrollo. Así en cerebelo de ratón donde la división celular es más rápida después del nacimiento, la ADN pol α aumenta del día 2 al día 6 y luego decrece a un nivel casi despreciable en el adulto, mientras que la actividad de la ADN pol β varía muy poco en ese período. Por otro lado en la corteza cerebral, donde no hay casi división después del nacimiento, la actividad de la ADN pol α es muy

reducida a los dos días del nacimiento y decrece aún más hasta alcanzar las características del cerebro adulto. La actividad de la ADN pol β también decrece en forma continua hasta alcanzar los valores del cerebro adulto.

Stockdale y otros encontraron que cuando las células musculares se unen para formar células diferenciadas, éstas ya no replican más su ADN nuclear y pierden 90% de la actividad de ADN polimerasa. A pesar de ello, esas células mantienen su capacidad de reparar el ADN (82-83).

Weissbach y colaboradores observaron que cuando las células HeLa se dividen logarítmicamente la enzima citoplasmática es la que tiene mayor actividad.

Craig y Keir (84) observaron la relación de la ADN pol α y ADN pol β de células BHK en distintos estados fisiológicos y mostraron que la actividad de la ADN pol α en células que crecían exponencialmente es 11.3 veces mayor que en células en reposo. La actividad de la ADN pol β , en cambio, es relativamente independiente del estado fisiológico de las células.

ADN polimerasa γ

La separación de esta enzima y su diferenciación de las ADN pol α y ADN pol β en células HeLa fue descrita inicialmente por Fridlender, Weissbach y colaboradores (57). La ADN polimerasa γ también se encontró en linfocitos humanos (85), embriones de pollo, hígado de ratón, células de timo de ternera y en algunos otros tejidos (86-87).

La actividad de la ADN polimerasa γ en células HeLa sincronizadas (58), muestra un único aumento justo antes del comienzo y en forma paralela a la síntesis del ADN.

Muchos investigadores han sugerido (51) que la ADN pol γ puede estar relacionada a la ADN polimerasa dependiente de ARN de los virus oncogénicos a ARN, reflejando de esta forma la presencia de partículas virales en la célula. Pero este problema aún no se ha dilucidado.

ADN polimerasa mt

Las mitocondrias y cloroplastos parecen existir semiautónomamente, es decir que su división y al menos parte de sus funciones fisiológicas son independientes del control nuclear, debido a que estos componentes celulares contienen su propio ADN (88). Se aisló y purificó una ADN polimerasa de mitocondria de hígado de ratón (89-90) y otra de levadura (91).

También se aisló y purificó una ADN polimerasa de mitocondrias de células HeLa (92-93). Fry y Weissbach (59) mostraron que la polimerasa mt de células HeLa difiere claramente de la ADN polimerasa α . Una característica que la diferencia de las otras ADN polimerasas celulares, es su incapacidad para copiar el oligo-homopolímero $(dC)_n dG_{15}$.

Soriano (94) encontró una polimerasa en mitocondria de cerebro de embriones de pollo cuya función no se conoce todavía. Esta enzima incorpora preferencialmente dGTP en los polinucleótidos sintéticos poli(dG).poli(dC) y poli(dG).poli(rC).

En mitocondria de Tetrahimena se encontró y purificó una poli-

merasa cuya función in vivo no se conoce pero que es inducida como respuesta a ciertos daños producidos en el ADN mitocondrial y que está presente en grandes cantidades durante los procesos de reparación (95).

Finalmente algunos investigadores (93) han discutido la posibilidad de que existan en mitocondria de mamíferos dos polimerasas distintas, aunque esto no se ha verificado aún.

Otras ADN polimerasas de eucariotes

Las ADN polimerasas dependientes de ARN se encontraron en muchos virus oncogénicos a ARN y en algunas células infectadas (96-97-98).

En células normales la búsqueda de estas enzimas resulta bastante difícil, debido a la presencia de la ADN polimerasa δ , ya que ambas enzimas utilizan eficientemente $(dT)_{12}$ rA como templado, si bien sólo las transcriptasas inversas pueden copiar eficientemente ARN natural.

Otra fuente de confusión puede provenir del hecho de que las ADN polimerasas dependientes de ADN pueden usar como iniciadores pequeños pedazos de ARN. Por ello se hace necesario distinguir entre la síntesis dependiente de ARN o aquella que usa ARN como iniciador. A pesar de ello existen algunas evidencias (33) de la existencia de esas actividades en células normales, aunque su rol en el metabolismo celular no es claro.

Deoxinucleotidil-Transferasa

Después del descubrimiento en células de eucariotes de las ADN

polimerasas de tipo replicativo, que requieren los cuatro deoxinucleósidos trifosfatos, Krakow (99) y otros investigadores encontraron otro tipo de polimerasa en timo de ternera que requiere uno sólo de los deoxiribonucleósidos trifosfatos para su máxima actividad.

La función de esta enzima aún se desconoce, aunque algunos investigadores la hacen responsable de la diversidad de anticuerpos.

Esta enzima simplemente polimeriza el deoxinucleótido disponible sobre el grupo 3'OH terminal del ADN de una sola cadena o ADN nativo.

Yoneda y Bollum (100) purificaron esta enzima y encontraron que está presente en la fracción citoplasmática de timo de ternera. Wang (101) observó esa actividad en la fracción proteica no histónica del núcleo.

Otros investigadores encontraron actividad de deoxinucleotidiltransferasa en núcleo de mucosa intestinal de ratón y en núcleo de hígado de ratón.

McCaffrey (102) y otros investigadores encontraron esta enzima en células de pacientes con leucemia linfoblástica aguda infantil.

Otras enzimas y proteínas ligadas al proceso de replicación en eucariotes

Si bien no se conoce aún cómo es el proceso de replicación en células eucariotes, existen algunos hechos que hacen pensar en un proceso similar al ya descrito para bacterias.

Waqar y Huberman (103), Fox (104) y otros investigadores propusieron que similarmente a lo que ocurre en sistemas bacterianos y en

fagos un pequeño pedazo de ARN está unido al ADN naciente en organismos superiores y además varios investigadores (105-106) postularon la existencia de una ribonucleasa (Ribonucleasa H) que en forma similar a la enzima de E. Coli hidroliza el segmento de ARN de los híbridos ARN-ADN.

Estudios hechos por Chang y Bollum (24) usando las ADN polimerasas de timo de ternera y la polimerasa de bajo PM aislada de médula de conejo muestran que sólo la polimerasa de alto PM es capaz de usar ARN para iniciar la síntesis de ADN.

También se aisló (107) una proteína de timo de ternera que desdobra la doble hélice del ADN y que estimula la polimerasa de alto PM en este tejido. Esta proteína si bien no parece ser necesaria para la replicación provee ADN de una sola cadena como templado y se asemeja mucho a la proteína aislada por Alberts del bacteriófago T₄ esencial para la replicación y recombinación genética del ADN del fago. Por último, también se encontró (33) en el núcleo meiótico de células de Lillium, en el núcleo de espermatoцитos y en varios mamíferos incluyendo humanos, una proteína semejante a la descrita ya en E. Coli que se une al ADN de una sola cadena y que estaría involucrada en el desenrollamiento de la doble hélice.

Variación de la ADN polimerasa de la célula entera durante el ciclo celular

Littlefield (108) y colaboradores y luego Gold (109) y Helleiner mostraron la variación de la actividad de la ADN polimerasa con los distintos sucesos del ciclo celular. Ellos usaron células L de

ratón sincronizadas con 5-fluor deoxiuridina y luego agregaron timidina para liberar la inhibición. Ambos grupos notaron que inmediatamente después del comienzo de la síntesis de ADN nuclear, había una pequeña redistribución de la actividad de la polimerasa de la fracción soluble a una fracción particulada.

Otros grupos (110) describieron la aparición de actividad de ADN polimerasa previo a cada aumento de ADN en células de levadura que se dividían sincronizadamente. Midieron la actividad enzimática solamente en homogenatos de células enteras y encontraron que si la replicación del ADN se retrasaba temporariamente la actividad de la polimerasa aumentaba y quedaba sin cambiar hasta tanto el ADN fuera sintetizado.

Howell y Hecht (111) usaron microsporas de *Lilium* sincronizadas naturalmente y examinaron la actividad de la ADN polimerasa y la polinucleótido ligasa en la fracción soluble preparada de células enteras en distintos estados del desarrollo. La actividad de la ADN polimerasa era alta durante la fracción S del ciclo aunque sin una asociación estricta con la replicación del ADN. La actividad de la ligasa sin embargo fluctuaba en forma directa con el período S, sugiriendo que el nivel de actividad de esta enzima podía estar involucrada de alguna forma con la replicación del ADN.

Otros investigadores criticaron (112-113) estos métodos de sincronización por bloqueo fisiológico de la síntesis de ADN aduciendo que esas células están sujetas a un crecimiento no balanceado al liberarlas del bloqueo, pudiendo provocar muchas alteraciones celulares que deben tenerse en consideración al interpretar los resultados.

Para evitar esta situación se usó un método de sincronización mecánica (33), eligiendo directamente células en mitosis.

Sus resultados (33) indicaron que la actividad de la ADN polimerasa en las fracciones particuladas y solubles eran mayores durante la fase S del ciclo mientras que la actividad de la DNAsa permanecía constante durante todo el ciclo.

La información obtenida por los grupos que usaron este método de sincronización mecánica no es clara ya que con esta forma de selección se obtiene sólo sincronización parcial. Esto es debido a que cambios rápidos o pequeños durante el ciclo celular no se manifiestan claramente.

Por último existen también algunos estudios en *Chlorella* (114) y *Tetrahymena* (33) que muestran un aumento continuo en la actividad de la ADN polimerasa durante varios ciclos celulares concluyendo que la replicación del ADN en esos organismos no es regulada por la cantidad de enzima en la célula.

Variación de la ADN polimerasa nuclear durante el ciclo celular

Existen pocos estudios relativos a núcleos aislados de células sincronizadas en donde se determine la cantidad de ADN polimerasa asociada a las diferentes fases del ciclo celular. Esto es debido principalmente al hecho de ser muy difícil la obtención de células sincronizadas, como para aislar núcleos en cantidades suficientes que permitan ensayar esas enzimas.

Brewer y Rusch (115) encontraron un pequeño aumento en la actividad de la ADN polimerasa en núcleos aislados de células en fase S.

Cuando se le agregaban conjuntamente un iniciador y espermina este aumento era mucho mayor. No se sabe el efecto que tiene la espermina sobre el núcleo, pero ellos sugieren que esta sustancia podría liberar o activar la ADN polimerasa, que luego usaría el iniciador para la síntesis. Estos resultados dan argumentos en contra a la hipótesis de que la cantidad de enzima en el núcleo es el factor que controla la iniciación de la replicación del ADN. El proceso de aislamiento podría ser el responsable de la inactivación de la enzima y la espermina podría actuar quizás reactivando la ADN polimerasa.

Hecht (116) examinó la actividad de la ADN polimerasa durante el ciclo meiótico naturalmente sincrónico de la microespora de *Lilium* y observó un aumento marcado en la actividad de la polimerasa unida al precipitado obtenido por centrifugación a alta velocidad, en la profase meiótica.

Contrariamente no había variación de la actividad de la polimerasa del sobrenadante, durante el ciclo celular meiótico.

Esos experimentos sugieren (33) una correlación entre las fases del ciclo celular ya sea mitótico o meiótico y el nivel de ADN polimerasa nuclear o asociada al núcleo.

Otros investigadores (117) sincronizaron células HeLa bloqueando la síntesis de ADN con ametopterina y mostraron que al liberarlas del inhibidor, la actividad de la polimerasa en núcleo aumentaba a medida que las células comenzaban a sintetizar el ADN, y luego disminuía a medida que la mayoría de las células habían sufrido ya mitosis y no replicaban su ADN.

Friedman (118) extendió estos estudios para incluir la actividad de las polimerasas nuclear y citoplasmática durante todo el ciclo. Nuevamente usó células HeLa sincronizadas y mostró que mientras la actividad de la polimerasa nuclear, usando ADN desnaturado como iniciador, llegaba a un máximo durante la fase S del ciclo, la citoplasmática permanecía constante prácticamente durante todo el ciclo.

Fansler y Loeb (46-47) han estudiado la relación entre la ADN polimerasa y la replicación en núcleos de embriones de erizo de mar, teniendo en cuenta la ventaja de su sincronización después de la fertilización. Los núcleos fueron aislados de embriones en distintas fases del ciclo de división, usando tres ciclos celulares (2-16 células). Los resultados obtenidos indican que la actividad de la polimerasa en núcleos aislados de células durante la fase S era cinco a diez veces mayor que en fracciones similares aisladas de embriones en los períodos G_2 y mitótico. A medida que la síntesis de ADN se completaba la actividad de la ADN polimerasa caía a un nivel algo mayor que antes de comenzar la fase S. La disminución de actividad de la enzima a medida que el período S se completa no parece ser resultado de un inhibidor que actúa sobre la polimerasa, aunque no se ha hecho un estudio exhaustivo sobre el tema.

Debido a que la actividad de la polimerasa del embrión entero se mantiene constante durante todo el ciclo celular, Fansler y Loeb concluyeron que la disminución de la actividad enzimática en núcleo es debida a una translocación de la polimerasa hacia el citoplasma.

Una cantidad residual de enzima queda asociada con el cromosoma

durante la mitosis y se acumula en el núcleo con cada división celular. La translocación se repite con cada ciclo.

Craig, Costello y Keir (73) estudiaron la distribución de las polimerasas de extractos de células BHK en las fases G_0 y S del ciclo celular. Ellos encontraron dos polimerasas, una nuclear y otra citoplasmática, y observaron que existe un cierto grado de asociación entre la enzima citoplasmática y el núcleo y que esta asociación está relacionada directamente con la velocidad de síntesis de ADN en vivo, siendo máxima en el pico de la fase S y luego decreciendo con la disminución de la síntesis de ADN.

Por otra parte la cantidad de la enzima nuclear no cambia durante el ciclo. Finalmente a medida que la velocidad de síntesis de ADN decrece hacia el final de la fase S, el total de actividad de la ADN polimerasa en citoplasma alcanza un máximo sólo después que la actividad nuclear ha comenzado a decrecer.

Replicación del ADN en linfocitos

Los linfocitos son un excelente sistema celular para investigar la replicación del ADN, ya que ofrecen la posibilidad de estudiar una célula que se puede obtener en distintos estados con respecto a la duplicación del ADN.

Aislados de sangre periférica normal están en estado de reposo. Algunas de estas células pueden sobrevivir en el cuerpo durante varios años sin dividirse y todavía retienen la capacidad de proliferar cuando se las expone a ciertos estímulos antigénicos. Cuando a esas células se las cultiva in vitro el estado de reposo continúa.

La síntesis de proteínas, ARN y ADN es mínima y por eso difícil de medir.

Sin embargo, esas células pueden activarse exponiéndolas en un cultivo a un grupo de sustancias conocidas como mitógenos (119). La estimulación lleva a una secuencia de cambios moleculares (120) que culminan con la replicación del ADN, la división celular y ciertas modificaciones morfológicas. Esos cambios se conocen como blastogénesis y ese sistema puede usarse para estudiar la transición de un estado de reposo a un estado de activa replicación.

En la estimulación de los linfocitos, uno de los incrementos mayores en la actividad enzimática corresponde a la ADN polimerasa. Este aumento es de 30 a 200 veces respecto a células no estimuladas (121) y ello permite estudios más detallados de los sucesos que llevan a la inducción de esta enzima,

Linfocitos T y B

En los últimos años se han acumulado un gran número de evidencias que prueban la heterogeneidad de los linfocitos (122). Estos resultados sugieren la existencia de dos tipos de subpoblaciones: células T y B.

Los linfocitos T provienen del timo en todos los vertebrados y son responsables, desde el punto de vista inmunológico, de la respuesta a nivel celular: hipersensibilidad retardada y rechazo de injertos.

Por otro lado, los linfocitos B derivan en los pájaros de la bolsa de Fabricius y en mamíferos se cree que provienen de un órgano

similar. Su función primaria es la de producir anticuerpos.

A pesar de que las células T no segregan anticuerpos, se sabe ahora que juegan un rol importante ayudando (123) en este proceso a las células B, aunque esta colaboración no es siempre esencial (124).

Ambos tipos de células tienen la capacidad de reconocer antígenos y en este fenómeno participan moléculas receptoras del tipo de las inmunoglobulinas sobre la superficie de los linfocitos.

Si bien las células B y T son heterogéneas, las células T tienen en promedio un tiempo de generación mayor, son un poco más grandes, más densas, menos adherentes a varios materiales (como vidrio, plástico, nylon) y están cargadas más negativamente que las células B.

Por los métodos usados generalmente en los laboratorios, para aislar linfocitos se obtienen predominantemente células T, con algunas B, macrófagos y un número pequeño de otras contaminantes. Aparentemente la transformación de los linfocitos requiere la interacción conjunta de varias de esas subpoblaciones.

Agentes estimulantes

Los linfocitos humanos pueden ser estimulados por un gran número de moléculas. Aquellos que se conocen como mitógenos no específicos estimulan los linfocitos sin una exposición previa y aparentemente no necesitan especificidad inmunológica. Entre los mitógenos de este tipo, los más potentes son los extractos de semillas pertenecientes a la familia de las Leguminosae, como la fitohemoaglutinina (PHA) (125), la concanavalina A (Con-A) (126) y los pokeweed (PWM) (127).

eritrocitos permitió purificar un glicopéptido que parece ser parte del sitio receptor al que se une la PHA. Este glicopéptido tiene un

Experimentos hechos por Agarwal, Blumberg y Loeb indican que si bien la estimulación provocada por extractos crudos de distintas semillas varía mucho, los cambios observados parecen ser similares y proporcionales al número de células que responden. Aparentemente los mitógenos actúan sólo como desencadenantes para iniciar una serie de sucesos que llevarían a la división celular.

Entre los mitógenos no específicos también están ciertos cationes divalentes, productos (128) bacterianos, anticuerpos (129-130) y enzimas proteolíticas.

Los linfocitos pueden ser estimulados específicamente por antígenos a los cuales esas células fueron previamente sensibilizadas in vivo.

Mitógenos no específicos

Fitoheмоaglutinina

La fitoheмоaglutinina es el mitógeno más utilizado para estudiar la transformación de linfocitos. Es una glicoproteína muy purificada (131) con un peso molecular de 138.000.

Tanto la actividad aglutinante de glóbulos rojos como la actividad mitogénica han sido separadas parcialmente durante su purificación y se han hecho estudios que sugieren que esas actividades residen en diferentes subunidades (132) de la molécula.

La capacidad de la fitoheмоaglutinina de unirse a membranas de eritrocitos permitió purificar un glicopéptido que parece ser parte del sitio receptor al que se une la PHA. Este glicopéptido tiene un peso molecular de 2.000 y al unirse a la PHA le impide actuar como

mitógeno sobre los linfocitos. Este hecho sugiere que esta molécula o alguna similar sirve de unión entre los linfocitos y la PHA.

Concanavalina A

Este mitógeno es una metaloproteína que no tiene la parte de hidrato de carbono (133-134). Esto muestra que el grupo carbohidrato no es un requerimiento absoluto para la estimulación de los linfocitos y que los mitógenos no son necesariamente glicoproteínas.

La Con-A tiene unida una molécula de Mn^{++} . Este catión, junto con Ca^{++} , están presentes en una serie de mitógenos extraídos de semillas. Experimentos hechos con quelantes indican que estos mitógenos requieren cationes fuertemente unidos para su actividad (135).

La estimulación de los linfocitos por Con-A puede revertirse por azúcares con residuos D-manosil o D-glucosil (134). En cambio, la estimulación por PHA se inhibe por residuos N-acetil-D-galactosamina.

Enzimas y moléculas pequeñas

Hay otro grupo de sustancias que actúan en grado menor, estimulando los linfocitos.

Estas son enzimas proteolíticas, cationes divalentes como el Zn^{++} , el Hg^{++} y el periodato de sodio.

Las enzimas proteolíticas alteran la membrana celular y parecen tener un rol en los primeros sucesos de la estimulación (136).

El periodato aparentemente provoca cambios químicos en grupos de azúcares de la membrana celular (137). El mercurio actúa sobre los grupos sulfhidrilo de muchas proteínas y el zinc es un metal que

se une fuertemente a enzimas y proteínas. Estos cationes provocan sólo una pequeña estimulación en concentraciones que no sean tóxicas para las células.

Antígenos

Los linfocitos de sangre periférica humana pueden estimularse en cultivo por antígenos a los que hayan sido expuestos anteriormente in vivo, por ejemplo: la tuberculina y la toxina del tétano. Pero los antígenos sólo estimulan un pequeño porcentaje de las células en una población.

Aunque los mitógenos y los antígenos parecen activar a los linfocitos por mecanismos distintos, la mayoría de los estudios indican que una vez que estas células son activadas los cambios moleculares que sufren son muy semejantes, independientemente de la forma que se usó para esa activación.

Mecanismo de acción de los mitógenos

Existe poca duda ahora que la reacción inicial de los linfocitos con los mitógenos tiene lugar a través de receptores de la superficie celular. En 1972 Greaves y Bauminger (138) mostraron que cuando los mitógenos se unían covalentemente a partículas de sefarosa, eran igualmente capaces de estimular los linfocitos de ratón. De esta forma demostraron que estos agentes no necesitan entrar en la célula para provocar la estimulación. En esos experimentos se vio que el complejo de sefarosa-PHA estimulaba células T y B, mientras que la PHA soluble estimulaba sólo las células T.

El concepto de que los mitógenos no entran a la célula está

apoyado por otros experimentos en que se estimulan células B con Con-A unida químicamente a placas de Petri (139) o unidas a partículas de acrílico (140).

Muchos de los sucesos que ocurren inmediatamente después de la estimulación de los linfocitos son cambios en el metabolismo nuclear y es difícil visualizar cómo alteraciones de la membrana celular producen cambios dentro del núcleo. Existen diversas teorías al respecto. Hirschhorn (141) y otros observaron que la estimulación de los linfocitos produce la liberación intracelular de enzimas de lisosomas y postularon que estas enzimas podrían migrar al núcleo para iniciar la activación de los genes. Otros investigadores (119) encontraron que inmediatamente después de la estimulación con PHA hay un aumento del AMP cíclico y propusieron que este metabolito actuaría como mensajero intracelular. Quastel y Kaplan (119) observaron que la estimulación por PHA provoca un aumento en el transporte del K^+ , sugiriendo que este cambio podría afectar la estructura de las nucleoproteínas.

Cambios moleculares asociados a la activación de los linfocitos

Los linfocitos humanos de sangre periférica son esencialmente células en reposo con un núcleo que se tiñe densamente y casi sin citoplasma. La cromatina está en estado condensado, se pueden ver sólo unos pocos polisomas en el citoplasma. Cuando a esas células se las estimula, aumentan de tamaño, su cromatina se vuelve menos condensada, el nucleolo se hace más visible al microscopio y aumenta la cantidad de citoplasma debido al gran desarrollo de retículo

endoplasmático. A las treinta y seis horas de agregado el mitógeno algunos de los linfocitos exhiben cambios mitóticos y comienzan a dividirse.

Usando como mitógeno PHA las células sufren dos o tres divisiones consecutivas y luego generalmente revierten a células en reposo. Aparentemente estas células pueden volverse a dividir si se las estimula nuevamente (142).

Varios investigadores han estudiado los cambios moleculares asociados a la estimulación por PHA.

Inmediatamente después del agregado de PHA, hay un aumento en la incorporación de uridina en el ARN, seguido por un aumento de incorporación de leucina en proteína y después de veinticuatro horas de estimulación algunas células comienzan a replicar el ADN (119), como se evidencia por la incorporación de timidina que alcanza a un máximo en tres a cuatro días.

Una secuencia de sucesos similares ocurren cuando se inicia la síntesis de ADN en otros sistemas, como células de hígado estimuladas por hepatectomía parcial o glándulas salivares estimuladas por isoproterinol (143). En todos estos casos en que se inicia la síntesis de ADN en células que estaban en reposo, ocurre una secuencia similar de cambios moleculares.

Loeb divide arbitrariamente los cambios que ocurren durante la transformación de linfocitos en cuatro períodos (119), y usa el comienzo de la síntesis de ADN como referencia entre experimentos de distintos laboratorios en los que las condiciones de los cultivos son diferentes.

Dentro de los sucesos que ocurren a las dos horas después de la estimulación se encuentran: alteraciones en la estructura y función de la membrana y cambios en el metabolismo nuclear. En relación a la membrana, los cambios incluyen un marcado aumento en la incorporación de un gran número de cationes y pequeñas moléculas. Aparentemente muchos de esos cambios no requieren la síntesis de nuevas proteínas y se deben sólo a modificaciones estructurales de la membrana celular.

Las transformaciones que ocurren en el núcleo parecen deberse a cambios en las proteínas estructurales y regulatorias del cromosoma.

Los sucesos que ocurren entre las 2 y 14 horas después de la estimulación se centran en los aumentos de la síntesis de ARN y en el montaje de los ribosomas para sintetizar las proteínas.

Los cambios tardíos que tienen lugar entre las 15 y 72 horas después de la estimulación están focalizados en la síntesis de ADN (45) y en el aumento de la actividad de las enzimas asociadas a esta replicación.

Entre 70 y 80 horas después de agregada la PHA la incorporación de timidina es máxima y luego disminuye hasta que cesa la síntesis de ADN a los 5 ó 6 días después de la estimulación.

Interacción de la PHA con el núcleo

Rubin (144) y otros investigadores estudiaron in vitro la interacción de la PHA con núcleo aislado de linfocitos y encontraron que este mitógeno puede estimular núcleos aislados obtenidos de

linfocitos en reposo. Así la síntesis de ARN (medida por la incorporación de ribonucleósidos tri-fosfatos) se incrementa dos veces. Por otro lado la velocidad de incorporación de los ribonucleósidos tri-fosfatos en núcleos obtenidos de células estimuladas por PHA es también dos veces mayor que la obtenida de núcleos de células sin estimular, lo cual sugiere una similitud entre los efectos provocados por la PHA en núcleos aislados con respecto a células intactas.

Los núcleos tratados directamente con PHA son también capaces de unir actinomicina D en forma más efectiva que núcleos no tratados, lo cual lleva a pensar que la PHA causa un desenmascaramiento de las regiones de ADN para la transcripción (119).

La acetilación de histonas es también mayor en núcleos tratados con PHA, siendo éste un proceso similar al que ocurre durante la transformación de los linfocitos (145). De todas formas, la estimulación directa de la síntesis de ARN en núcleos aislados por PHA no indica necesariamente que el sitio de acción de este mitógeno sea el mismo que in vivo.

Replicación de ADN en linfocitos

Se considera que los linfocitos humanos de sangre periférica normal están bloqueados en la fase G1 del ciclo celular, período en el cual no hay división.

Esto se hace evidente por:

- a) Medidas citoespectrofotométricas que indican que los linfocitos periféricos tienen un complemento diploide (2n) de ADN (146).

- b) Estudios citológicos que indican que la incorporación de timidina comienza entre las 16 y 20 horas después de la estimulación por PHA y siempre precede a la mitosis.
- c) La acumulación de células estimuladas en el punto G₁/S del ciclo celular después del agregado de inhibidores de la síntesis de ADN. De esta forma los linfocitos humanos deben replicar su ADN antes de la división celular y esta replicación se correlaciona en el tiempo con el aumento en la incorporación de timidina y la actividad de la polimerasa durante la transformación de los linfocitos (147-45).

Experimentos hechos con inhibidores de la síntesis de ARN muestran que ésta es necesaria para la inducción de ADN polimerasa en linfocitos estimulados por PHA. Así si se agrega pequeñas cantidades de actinomicina D (0.02 μ gr/ml) (148) a las seis horas después de la estimulación se observa un bloqueo en el aumento de la actividad de la ADN polimerasa y esto no sucede si el agregado se hace entre las 14 y 72 horas después de la estimulación.

Por otro lado también existe evidencia de la necesidad de una concomitante síntesis proteica para la inducción de las ADN polimerasas.

El agregado de puromicina (149) o cicloheximida en cualquier momento después de la estimulación y en cantidades suficientes como para prevenir el 90% de la síntesis de proteína provocada por la PHA impide también el aumento de la actividad de la polimerasa.

Se puede argumentar que la polimerasa no es sintetizada pero que está presente en los linfocitos no estimulados y lo que ocurre

durante la transformación de éstos es la inactivación de un inhibidor de la polimerasa.

Así la síntesis de ARN y proteína sería requerida para inactivar el inhibidor. Loeb (121-150) y otros investigadores mostraron que esto no es lo que ocurre en experimentos hechos mezclando extractos de células estimuladas y sin estimular.

Estimulación por PHA comparada con la estimulación por antígenos

Este problema no se ha resuelto todavía aunque se han hecho varios estudios para investigar la similitud entre la replicación de linfocitos estimulados con PHA y aquellos estimulados por antígenos. Lanotte y Panijel (151-152) usaron gradientes de ClCs para estudiar la replicación de células estimuladas con PHA en presencia de bromo-uracilo. El nuevo ADN sintetizado era un híbrido con una cadena parental liviana y una pesada conteniendo bromo-uracilo. Por otro lado estimulando las células por medio de antígenos con los que se las había sensibilizado anteriormente se observaban dos especies de ADN. Se postuló que una de ellas era propia de la estimulación antigénica y contenía genes relacionados a la formación de anticuerpos. Por otro lado Gottlieb (153) y otros investigadores encontraron que tanto la estimulación por PHA como la antigénica dan una distribución bimodal del ADN.

Relación entre la actividad de la ADN polimerasa y la replicación del ADN

Loeb y Agarwal (45) desarrollaron un método que permite medir en la misma muestra la capacidad de los linfocitos para incorporar

timidina y la actividad de la ADN polimerasa. La velocidad de síntesis de ADN se mide exponiendo los linfocitos estimulados a timidina tritiada por una hora. Luego, después de lavar las células por centrifugación con timidina no marcada se rompen los linfocitos por congelamiento y descongelamiento y se determina la actividad de la polimerasa usando timidina trifosfato ($\propto P^{32}$) como sustrato. Observaron que la composición del ADN sintetizado es similar a la del ADN que usaron como templado. También encontraron que excepto por un pequeño incremento de la actividad de la polimerasa justo antes del comienzo de la síntesis de ADN, la actividad de la enzima se correlaciona exactamente con la velocidad de incorporación de timidina. Loeb y Agarwal sugieren de estos resultados que esta polimerasa está directamente relacionada con la replicación cromosomal del ADN.

Relación entre la replicación de ADN en
célula entera y núcleo aislado

Fridlender, Medrano y Mordoh (154) compararon la capacidad de sintetizar ADN de linfocitos en reposo y estimulados por PHA usando células enteras, núcleos aislados y extractos celulares. También observaron la actividad de la ADN polimerasa en células estimuladas y sin estimular.

Utilizando como precursor de la síntesis de ADN (3H)TTP encontraron que tanto los núcleos aislados de linfocitos estimulados como sin estimular incorporaban igualmente bien TTP. Pero esto no ocurría cuando usaban células enteras; en ese caso sólo los linfocitos estimulados podían replicar el ADN. La síntesis de ADN en célula entera

se seguía por la incorporación de (^3H)dT. Se encontró también que tanto las células estimuladas como las sin estimular contienen ADN polimerasas, aunque la actividad de la enzima es mayor en los linfocitos estimulados.

Para explicar todos estos hechos se sugirió que los linfocitos no estimulados son incapaces de usar dT como precursor de ADN al nivel de célula entera, en cambio poseen la maquinaria enzimática necesaria a nivel de núcleo aislado para usar los deoxiribonucleósidos trifosfatos como precursores.

Sus resultados muestran efectivamente que las células estimuladas por PHA tienen un reservorio de dT mayor que las células no estimuladas. Por otro lado se observó que el transporte de P^{32} no cambia con la estimulación por PHA.

Concluyendo, la disponibilidad de precursores debe constituir un paso importante en la regulación de la síntesis de ADN en linfocitos.

ADN polimerasas de linfocitos humanos

Hasta ahora no se han hecho muchos estudios sobre las ADN polimerasas de linfocitos humanos.

Bobrow (155) y otros investigadores mostraron la existencia de una enzima en las fracciones particuladas del citoplasma, que es sensible a la ribonucleasa y que no se encuentra en linfocitos sin estimular. Esta enzima tiene las propiedades de las ADN polimerasas dependientes de ADN: prefiere ADN como templado iniciador respecto a los híbridos sintéticos ARN/ADN. Además esta enzima no transcribe

las regiones heteropoliméricas de los ARN exógenos naturales de una sola cadena, lo que la distingue de la transcriptasa inversa encontrada en virus oncogénicos a ARN y en células humanas leucémicas.

Smith y Gallo (156) separaron y purificaron dos polimerasas de homogenatos de células enteras de linfocitos humanos estimulados con fitohemoaglutinina que coinciden con la ADN pol α y ADN pol β encontrada y caracterizada en otras células de mamíferos.

Los pesos moleculares de estas enzimas se estudiaron por medio de gradientes de sacarosa y por cromatografía por columnas de Sephadex G200, y son de 150.000 para la ADN pol α y 30.000 para la ADN pol β . Se encontró también que tanto la ADN pol α como la ADN pol β tenían una pequeña actividad de exonucleasa en ausencia de los deoxinucleósidos trifosfatos y que la ADN pol α contenía actividad de endonucleasa.

El orden en que eluyen las ADN pol α y la ADN pol β de columnas de fosfocelulosa sugiere que la ADN pol β es más básica que la ADN pol α . La ADN pol α es inhibida por 0.5 M N-etilmaleimida, mientras que esta concentración no afecta a la ADN pol β .

El pH óptimo de las ADN pol α y ADN pol β es de 7.3 y 7.9 respectivamente usando ADN activado como templado.

Tanto la ADN pol α como la ADN pol β prefieren como templado iniciador $(dA)_n dT_{10}$ con respecto a $(A)_n dT_{12-18}$ en presencia de Mg^{++} . Cuando el Mg^{++} se sustituye por Mn^{++} sin embargo aumenta la síntesis con $(A)_n dT_{12-18}$. Esto no ocurre con las ADN polimerasas dependientes de ARN que prefieren $(A)_n dT_{12-18}$ aún en presencia de Mg^{++} . Además ni la ADN pol α ni la ADN pol β pueden usar $(C)_n dG_{12}$ como templado en presencia de Mg^{++} a diferencia de lo que ocurre con las ADN

polimerasas virales dependientes de ARN.

Lewis, Abrell, Smith y Gallo (157) aislaron también la ADN polimerasa γ de linfocitos humanos en cultivo. Encontraron que por los métodos utilizados hasta ese momento para separar las ADN polimerasas de linfocitos humanos, la ADN pol γ quedaba mezclada con la ADN pol α . Para poder separar las dos enzimas fue necesario después de la cromatografía por DEAE y fosfocelulosa, hacer una cromatografía en columnas de ADN celulosa.

La ADN pol γ podía diferenciarse de la ADN pol α en que, a pesar de usar ADN activado en presencia de Mg^{++} la enzima era más activa con $(dT)_{12-18} (A)_n$ y Mn^{++} .

Por otro lado podía diferenciarse de la transcriptasa inversa de células leucémicas en cuanto no podían transcribir las regiones heteropoliméricas del ARN de los virus oncogénicos a ARN, ni usar como iniciador templado $(dG)_{12-18} (C)_n$.

Tyrsted, Munch Petersen y Cloos (150) estudiaron los requerimientos y condiciones óptimas para la actividad de la ADN polimerasa en extractos crudos de linfocitos sin estimular y estimulados con PHA. Se encontró que existían diferencias entre esas enzimas en cuanto a la estabilidad térmica y al efecto inhibitorio del ClK y del p-cloromercuribenzoato. Observaron también que usando ADN de timo de ternera como templado y linfocitos sin estimular, en ausencia de dATP, dCTP, y dGTP disminuía la incorporación de (^3H) dTTP del producto ácido insoluble en 25% a 30% con respecto al obtenido en presencia de los cuatro deoxinucleósidos trifosfatos. Pero esta disminución era sólo de 15% en el caso de linfocitos estimulados.

OBJETO DEL TRABAJO

El descubrimiento de las ADN polimerasas ARN dependientes de virus oncogénicos a ARN y su relación con el cáncer (96-97-98) trajo como consecuencia que muchos investigadores comenzaran una búsqueda de las ADN polimerasas de células normales como paso previo a entender el posible efecto de una infección viral sobre el contenido de las polimerasas celulares.

Existe una gran cantidad de información tanto en células de procariotes como de eucariotes sobre las enzimas capaces de catalizar la síntesis de ADN. Sin embargo la prueba unívoca de que una ADN polimerasa dada es responsable de una determinada función en células de eucariotes depende, como ocurre con las enzimas bacterianas, de evidencias genéticas.

En organismos superiores no se conocen todavía mutantes de replicación de ADN, de ahí que sea necesario un sistema que permita estudiar las distintas enzimas y correlacionar las actividades bioquímicas con las funciones celulares.

Los linfocitos humanos de sangre periférica son un buen sistema. Son células bien diferenciadas que rara vez se dividen in vivo y que pueden tener una vida media larga. En cultivo este estado continúa, a menos que se los estimule por la adición de PHA (125), o por una

variedad de otros sustratos (126-128-129) incluyendo estímulos inmunológicos apropiados. Estas sustancias provocan cambios en los linfocitos transformándolos en células metabólicamente activas, conocidas como blastos. Se sabe ya que los linfocitos estimulados por PHA sufren durante la transformación un aumento bastante grande de la actividad de ADN polimerasa (45), lo que hace que este sistema sea muy conveniente para el estudio de la replicación del ADN.

Fridlender, Medrano y Mordoh (154) observaron que si bien los linfocitos estimulados incrementan la replicación del ADN respecto a los linfocitos no estimulados, los núcleos aislados de ambas células incorporan igualmente bien los deoxinucleósidos trifosfatos.

Estos resultados crearon grandes dudas sobre la significación del aumento de actividad de ADN polimerasa en la célula entera. Esto podría deberse a un aumento en la actividad de un único tipo de ADN polimerasa o a la producción de nuevas especies enzimáticas.

En el caso de los linfocitos humanos se han descrito tres ADN polimerasas ADN dependientes. Sin embargo su distribución celular en las células estimuladas, así como su presencia y características en los linfocitos normales no estimulados no se conoce todavía.

El presente trabajo de tesis comprende el aislamiento, purificación y el estudio de las propiedades de las ADN polimerasas de citoplasma y núcleo de linfocitos sin estimular y estimulados por PHA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de linfocitos

Se mezclaron 500 ml de sangre fresca normal heparinizada (10 U/ml) con 30 ml de Dextrano T500 10% (disuelto previamente en ClNa 0.9%) y se dejó sedimentar por gravedad durante 90 minutos. El plasma sobrenadante se pasó a través de una columna estéril de fibras de nylon (Hilandería Chilavert, Argentina) previamente lavada con 250 ml de bufer fosfato salino PBS (ClNa 130mM, ClK 2.6mM, PO_4HNa_2 8mM, PO_4H_2K 1.4mM, Cl_2Ca anhidro 0.9mM, $Cl_2Mg \cdot 6 H_2O$ 0.4mM). Después de 30 minutos a 37° C el eluido se recogió y centrifugó a 100g por 30 minutos. El sobrenadante se pasó nuevamente a través de una columna y se volvió a centrifugar. Los precipitados se lavaron una vez con 20 ml de PBS, se resuspendieron en el mismo volumen de PBS y 10 ml de la solución se sembraron sobre 10 ml de un gradiente de Ficoll (5 ml de Ficoll 12%, 3 ml de Isopaque 50% y 2 ml de PBS). Los gradientes se centrifugaron en el rotor HB-4 de Sorvall por 10 minutos a 480g. La interfase se separó y diluyó con PBS. Se centrifugó a 2.000g por 10 minutos. El precipitado se resuspendió a una concentración de 1×10^6 células/ml en Eagle's Minimal Essential Medium, que contenía 20% de suero bovino fetal, Hepes (N-2 hidroxietilpiperazina N'2 ácido etanosulfónico)

20mM (ph 7.2), glutamina 1mM, penicilina 100 U/ml y estreptomina 100 µg/ml. Cuando se preparaban linfocitos estimulados se agregaba al cultivo 0.15 ml de fitohemoaglutinina (PHA, Difco reconstituida en 5 ml de H₂O bidestilada) por cada 100 ml de cultivo. Los cultivos se incubaron a 37° C por 72 horas.

Recuento de linfocitos

Al precipitado de 2.000g obtenido como se explica más arriba se lo disolvió en 20 ml de PBS. Se toma una alícuota y se la diluye 1/20 con líquido de Turk (ácido acético-violeta de genciana). Se hace el conteo en una cámara cuenta glóbulos.

Preparación de extractos citoplasmáticos y nucleares sin estimular y estimulados con PHA

Se juntaron aproximadamente 600×10^6 linfocitos sin estimular o estimulados con PHA. Se resuspendieron en 2.5 ml de TED (buffer Tris 50mM ph 7.8, EDTA 1mM, ditiotreitól 1mM). Después de dejarlos en hielo 15 minutos, la suspensión se homogeneizó 40 veces en un homogeneizador Dounce, se agregó glicerol (concentración final 10% en volumen) y se centrifugó durante 15 minutos a 8.500 rpm. El sobrenadante se centrifugó 30 minutos a 40.000g en Sorvall y este sobrenadante se usó como Extracto citoplasmático. El precipitado de 8.500 rpm se lo resuspendió en 3 ml de TEDG (Tris 50mM ph 7.8, EDTA 1mM, ditiotreitól 1mM, glicerol 10%) y Tritón N101 0,3%, y después de dejarlos 15 minutos en hielo se homogeneizó en Dounce 15 veces. Se centrifugó 10 minutos a 2.500 rpm. Se repitió este paso (el sobrenadante es el

Lavado de Tritón) y al precipitado se lo resuspendió en 1 ml de TEDG. Se agregó 1 ml de ClK 1.6M en TEDG. Se dejó la preparación 2 horas en hielo y se centrifugó una hora y media a 40.000 rpm. El sobrenadante se dializó toda la noche contra 500 ml de TEDG y se centrifugó 10 minutos a 10.000 rpm. El sobrenadante es el Extracto nuclear, y el precipitado es el Precipitado nuclear.

Preparación de columnas de DEAE celulosa
y cromatografía de la ADN polimerasa

50 gr de DEAE Whatman (dietilamino etil celulosa) microgranular DE-52 prehinchada, se lavaron tres veces con 300 ml de bufer fosfato 0.02M ph 7.5. Se deja decantar y se saca el sobrenadante. Se agrega 100 ml de bufer y se coloca 50 ml de resina en una columna. Se lava con 100 ml de bufer fosfato 0.7M y luego con TEMG (Tris 50mM ph 7.8, EDTA 1mM, mercaptoetanol 3mM, glicerol 10%) hasta que la conductividad del eluido sea igual al de TEMG. Se carga una columna Pharmacia (0.9 x 13.5 cm) hasta un volumen de 7.6 ml. Se lava con 20 ml de bufer TEDG. Se carga la columna con la muestra conteniendo 10 mgr/ml de proteína, en caso de que la muestra tenga menos proteína se le agrega albúmina de suero de bovino (SAB) hasta completar esa concentración. Se lava con 7 ml de bufer TEDG y se eluye con 40 ml de un gradiente lineal de ClNa (0-0.4M). Se recogen 40 fracciones de 1.5 ml cada una, en tubos conteniendo 50 λ de SAB 9 mgr/ml. Se ensayó la actividad de la ADN polimerasa de cada fracción.

Preparación y calibración de columnas de Sephadex

Se usó Sephadex G150 (Pharmacia). Se disuelven 5 gr/225 ml de TEDG. Se deja 24 horas para que las partículas se hinchen y luego se les sacan las burbujas de aire.

Se carga una columna (0.9 x 19 cm) con 12 ml de Sephadex. Para determinar el volumen muerto de la columna se usa una solución de Blue dextran (0.5 ml de una solución 0.2%). Se eluye luego con TEDG ClNa 100mM y se recogen fracciones de 0.5 ml. La concentración de Blue dextran se determina leyendo la densidad óptica a 630 m μ . La columna también se calibró con albúmina de suero bovino (PM 67.000), peroxidasa de rabanito (0.5 ml de una solución 4 mgr/ml) PM = 44.000 y citocromo C de músculo de corazón de caballo (0.5 ml de una solución 37mM) PM = 13.000.

La actividad de la peroxidasa de rabanito y la determinación de la albúmina de suero bovino y citocromo C se describen más adelante.

Preparación de gradientes de sacarosa

Se junta el volumen de los tubos que contenían la actividad enzimática de las columnas de DEAE y se dializa durante tres horas contra 100 volúmenes de TEDG. Luego se concentra a aproximadamente 1/10 de su volumen con Ficoll. Se colocó sobre 4.6 ml de un gradiente de sacarosa (10%-30%) en TED, una solución conteniendo 200 λ de ADN polimerasa, 50 λ de fosfatasa alcalina 1 mgr/ml y 50 λ de alcohol deshidrogenasa de levadura 5 mgr/ml.

Los gradientes se centrifugaron en un rotor SW65 Spinco a 40.000 rpm durante 15 horas.

Se recogieron fracciones de 0.2 ml, aspirando desde el fondo del tubo con una bomba peristáltica. Los tubos contenían 10 μ l de albúmina de suero bovino 9 mgr/ml. Se determinó en cada fracción la actividad de ADN polimerasa, fosfatasa alcalina y deshidrogenasa según los métodos que se describen a continuación.

Ensayo de actividad de la ADN polimerasa

La mezcla de reacción contiene (a menos que se indique de otra forma) en un volumen de 0.1 ml: ADN activado 62 μ gr, Tris 50mM pH: 8, Cl_2Mg 5mM, albúmina de suero bovino 0.9 mgr/ml, DTT 5mM, cada uno de los siguientes deoxinucleósidos trifosfatos: dGTP, dCTP, dATP, 0.1mM, (H^3)dTTP 0.01mM actividad específica 1.000 cpm/p mol y 20 μ l de enzima. Se incuba a 37° C durante 45 minutos. La reacción se para con 1.5 ml de una mezcla de 0.2 ml de ADN carrier 2.5 mgr/ml, 0.1 ml de pirofosfato de sodio 0.1M y 1.2 ml de H_2O . Se agregan 0.25 ml de PCA 12%. Se centrifuga 5 minutos a 6.000 rpm. El precipitado se disuelve en 0.5 ml de HONa 0.2N.

Se le agrega 1 ml de H_2O y 0.25 ml de PCA 12%. Se repite el procedimiento y se redisuelve en 0.3 ml de protosol. Se les agrega mezcla de centelleo (solución de Omnifluor-New England 4 gr/l de tolueno, ácido acético glacial 2 ml/l). Se cuenta en un centelleador líquido Packard.

Activación del ADN

A cada 2 ml de solución de ADN 2.5 mgr/ml de timo de ternera se le agregan Cl_2Mg 5mM y 0.4 μgr de deoxiribonucleasa (Worthington, 3.200 U/mgr). Se incuba 5 minutos a 37° C. Se inactiva 10 minutos a 60° C.

Ensayo de la actividad de la peroxidasa de rabanito

Se siguió el método descrito en el catálogo de enzimas de Worthington.

Sustrato: 1 ml de H_2O_2 0.3% diluida a 100 con bufer fosfato 0.01M ph 6.

Colorante: O-dianisidina 1% en alcohol metílico.

Mezcla: agregar 0.05 ml de colorante cada 6 ml de sustrato

Se agrega a 1 ml de mezcla 5 λ de enzima de cada fracción y se lee la absorción a 460 m μ cada 15 segundos

Determinación de la actividad de la alcohol deshidrogenasa de levadura

Se siguió el procedimiento de Martin y Ames (159).

Mezcla de reacción:

Por ml la mezcla contiene

170 μmoles de etanol

50 mM Tris ph 8.5

15 μM NAD

A 1 ml de mezcla de reacción se le agregan 20 λ de enzima para cada fracción. Se lee la absorción a 340 m μ cada 30 segundos.

Determinación de la actividad de la
fosfatasa alcalina de E. Coli

Se siguió el método descrito en el catálogo de enzimas de Worthington.

Sustrato: p-nitro fenil fosfato en Tris 1M, ph 8.

Se agrega a 1 ml de sustrato 50 λ de enzima de cada fracción.
Se lee absorción a 410 m μ cada 30 segundos.

Determinación de albúmina de suero bovino

Se mide la cantidad de proteína, usando el método de Lowry et al.
Se lee la densidad óptica a 700 m μ .

Determinación de citocromo C

Se lee la densidad óptica a 400 m μ .

Medición de la conductividad

La conductividad se determinó en un Radiometer tipo CDM 2e.
Se prepararon diluciones de 50 λ de muestra con 20 ml de H₂O bides-tilada y se midió la conductividad de la muestra. En todos los casos se hizo una curva standard midiendo la conductividad de soluciones preparadas con distintas concentraciones salinas.

RESULTADOS

Controles de la estimulación de los linfocitos

Es bien sabido que cuando se estimulan linfocitos con PHA (125) éstos entran en división mitótica. Por ello como paso previo a trabajar con linfocitos estimulados verificamos la transformación blástica por:

- a) Incorporación de timidina tritiada.
- b) Por microscopía.

Velocidad de incorporación de timidina

Para observar mejor las diferencias que ocurren entre las polimerasas de linfocitos estimulados por PHA y sin estimular se trató en todos los experimentos de usar células que estuvieran en el momento de máxima replicación de su ADN. Fue necesario por ello, conocer el tiempo que los linfocitos debían incubarse con PHA en las condiciones usadas en nuestro laboratorio para obtener la máxima incorporación de timidina.

De la fig. 1 se observa que la incorporación de timidina no es detectable hasta unas 24 horas posteriores a la estimulación. Luego aumenta rápidamente hasta alcanzar un máximo de incorporación a las 72 horas de agregada la PHA.

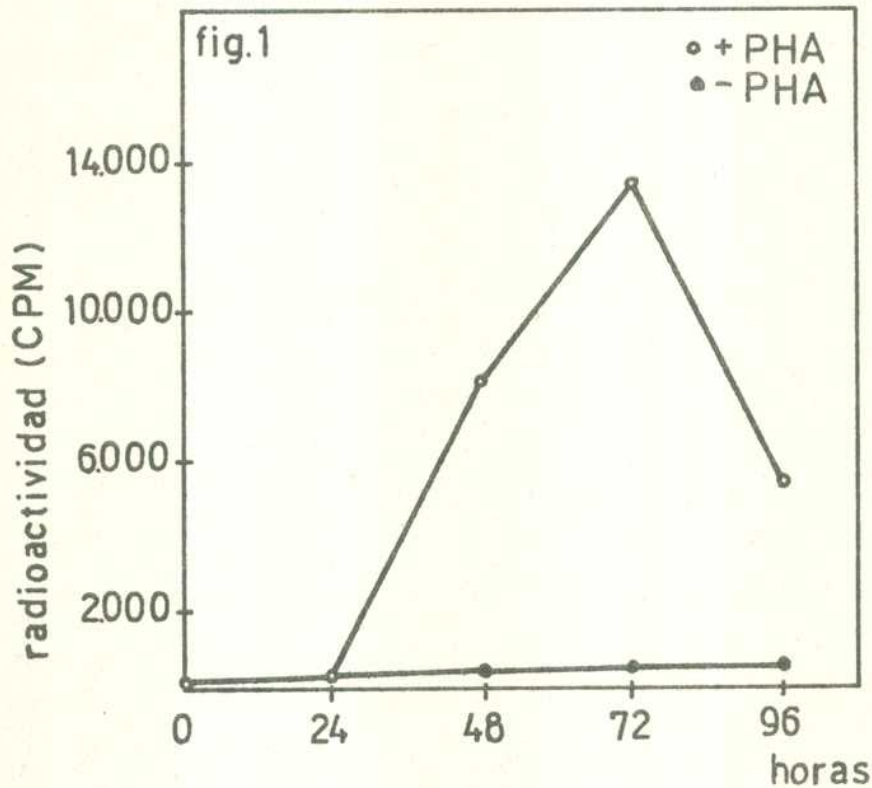
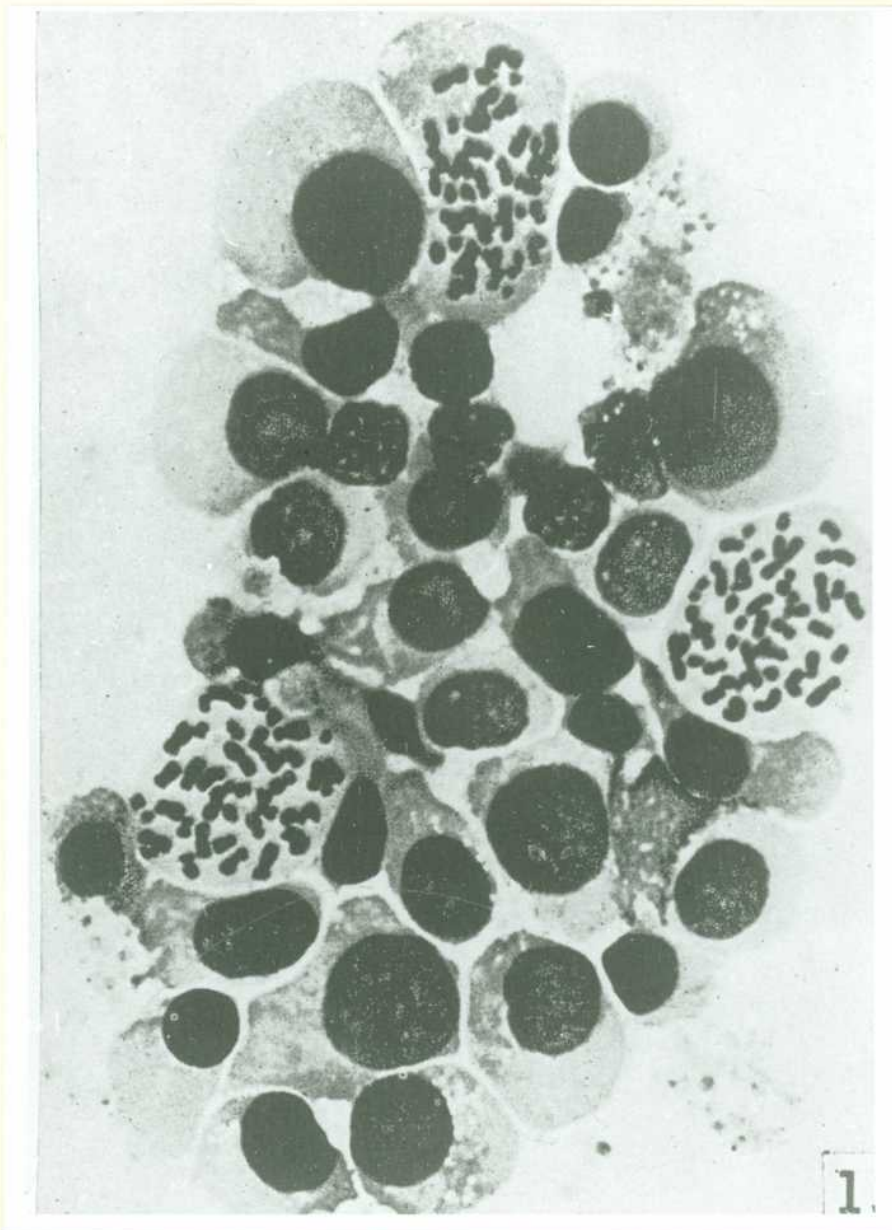


Fig. 1: Los linfocitos se prepararon según se explica en *Materiales y Métodos*. Se sacaron muestras de 2 ml de cultivo (aproximadamente 2×10^6 linfocitos) a los tiempos indicados y se les agregó 2 μ ci de (3 H)dT. (New England Nuclear, actividad específica 20 ci/mM, concentración final 0.025 μ M). Se incubaron durante 3 horas a 37° C. Los pulsos fueron terminados centrifugando las células y resuspendiendo los precipitados en 1 ml de agua destilada. Después de dejarlos 5 minutos en hielo se les agregó 1 ml de TCA 10% y los precipitados se recogieron en filtros Whatman GF/C. Se los lavó luego con 20 ml de una solución fría de ClH 0.2M, pirofosfato de sodio 0.03M, posteriormente con 10 ml de ClH 0.05M y por último con etanol. Se los dejó secar. Los filtros se colocaron en viales, se les agregó líquido de centelleo (4 gr de Omnifluor/litro de tolueno) y se los contó en un centelleador Packard.

Transformación blástica de los linfocitos por medio de PHA

Los cultivos de linfocitos estimulados se observaron al microscopio, para ello las muestras de los cultivos se extendieron sobre porta objetos, se secaron al aire y se las tiñó con May Grünwald-Giemsa. La transformación blástica se juzgó en base al aumento de tamaño de las células, la basofilia del citoplasma, las características del teñido nuclear y los múltiples nucleolos.



Distribución subcelular de la actividad de
la ADN polimerasa de linfocitos humanos

Estudios hechos en este laboratorio (154), habían ya mostrado la existencia de actividad de ADN polimerasa en citoplasma y núcleo de linfocitos estimulados y sin estimular, aunque no se había estudiado la distribución subcelular de esas enzimas. Friedman (117-118) en células HeLa, Fansler y Loeb (46-47) en embriones de erizo de mar estudiaron las variaciones de las ADN polimerasas en las distintas fases del ciclo celular y observaron que había un aumento de la enzima de núcleo y una disminución de la polimerasa de citoplasma durante la fase S del ciclo celular con respecto a las células en reposo. Esto podía indicar un pasaje de la enzima citoplasmática al núcleo. De ahí que se pensó que el estudio de la distribución subcelular de la ADN polimerasa en células en reposo respecto a células en activa replicación puede ayudarnos a entender el mecanismo de replicación del ADN y la función de estas enzimas.

La obtención de los linfocitos, su estimulación y el aislamiento de las distintas fracciones subcelulares, así como la determinación de la actividad enzimática y la medición de proteínas fue descrita ya en Materiales y Métodos.

Previo a la determinación de la distribución subcelular se midió la linealidad de la reacción enzimática con la cantidad de proteína para las distintas fracciones. Se observa de la fig. 2 que la actividad de la ADN polimerasa de linfocitos estimulados y sin estimular guarda una relación lineal hasta una concentración de apro-

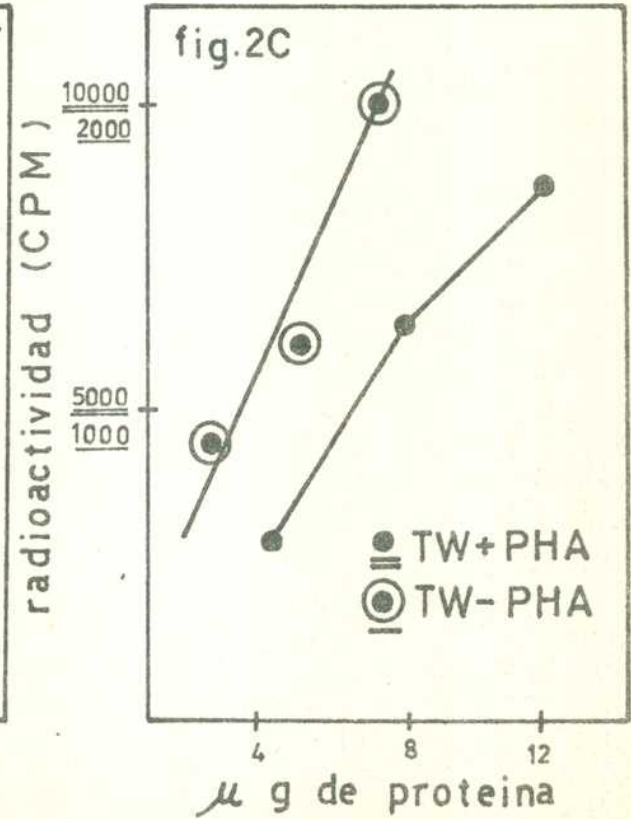
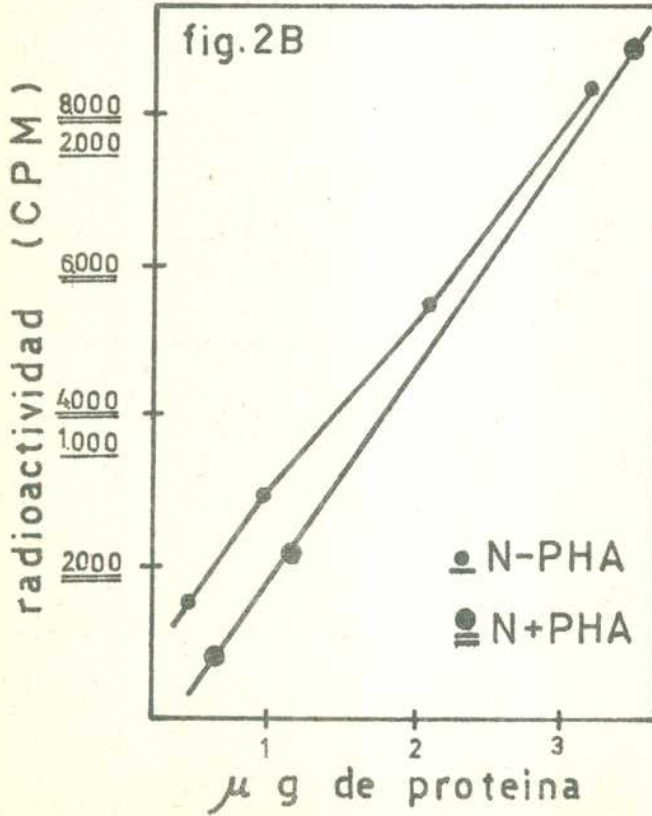
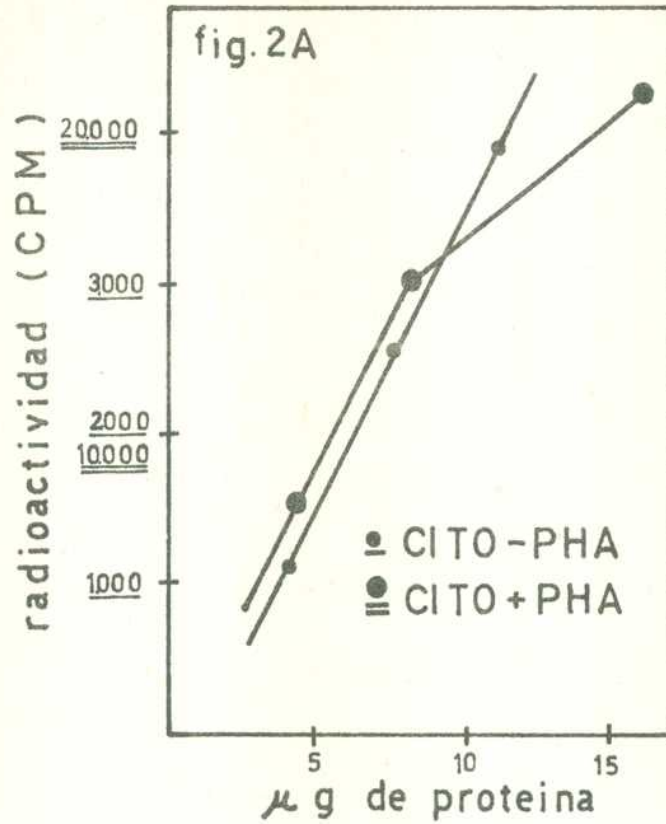
ximadamente 8 μ gr de proteína correspondiente a las distintas fracciones subcelulares.

De las tablas I y II se observa que existe actividad de ADN polimerasa en núcleo y citoplasma de linfocitos humanos sin estimular y en los estimulados por PHA.

Si bien existe una diferencia cuantitativa en cuanto a la actividad de la polimerasa en linfocitos estimulados y sin estimular, la distribución subcelular de la actividad enzimática es muy similar en ambos tipos de células.

Por otro lado, al igual que en otras células de eucariotes, la mayor parte de la actividad de la ADN polimerasa se encuentra en citoplasma.

Actividad de la ADN polimerasa de linfocitos sin estimular y estimulados por PHA en función de la concentración de enzima



Leyenda correspondiente a la Fig. 2: Para la preparación de las distintas fracciones subcelulares se parte de aproximadamente 600×10^6 linfocitos estimulados o sin estimular. Para poder determinar la actividad de la ADN polimerasa y medir proteínas se procedió de la siguiente forma:

- a) Al homogenato total se le agregó tritón N101 hasta una concentración final de 0.3%.
- b) Al precipitado de 40.000 g se lo resuspendió en 0.5 ml de bufer tritón.
- c) Al precipitado nuclear se lo disolvió en 200 λ de ClK 0.8M en bufer TEDG.

La determinación de la actividad enzimática y la medición de proteínas se describe en Materiales y Métodos.

- Fig. 2 A. Fracción citoplasmática.
Fig. 2 B. Fracción soluble nuclear.
Fig. 2 C. Lavado de tritón.

Tabla I

Distribución subcelular de la actividad de la ADN polimerasa de
linfocitos humanos sin estimular

Fuente de enzima	mgr de proteína totales	cpm x 10 ⁻³ totales	Actividad específica cpm/mgr de proteína x 10 ⁻³	% Actividad total
Homogenato total	18.7	5.300	283	100
Extracto citoplasmático	10	3.350	335	64
Precipitado de 40.000 g	1.45	175	121	3.3
Lavado de tritón	4.5	806	179	15.3
Fracción nuclear soluble	1.4	824	588	15.7
Precipitado nuclear	0.24	80	333	1.5

Tabla II

Distribución subcelular de la actividad de la ADN polimerasa de
linfocitos humanos estimulados con PHA

Fuente de enzima	mgr de proteína totales	cpm x 10 ⁻³ totales	Actividad específica cpm/mgr de proteína x 10 ⁻³	% Actividad total
Homogenato total	52.5	74.000	1.409	100
Extracto citoplasmático	26.2	49.963	1.907	67.7
Precipitado de 40.000 g	2.60	1.651	635	2.2
Lavado de tritón	21.6	11.868	549.4	16.1
Fracción nuclear soluble	6	10.080	1.680	13.7
Precipitado nuclear	1	192	192	0.2

Leyendas correspondientes a las Tablas I y II:

Los linfocitos se prepararon según se explica en Materiales y Métodos. En el caso de los linfocitos estimulados éstos se incubaron con PHA a 37° C por 72 horas.

Para el aislamiento de las fracciones subcelulares se partió tanto en el caso de linfocitos estimulados como en los sin estimular de aproximadamente 600×10^6 linfocitos. La actividad enzimática se midió por el método descrito en Materiales y Métodos, salvo que se incubó durante 1 hora a 37° C.

ADN polimerasas de linfocitos sin estimular

Se analizaron por cromatografía en columnas de celulosa DE52, las actividades del extracto citoplasmático y de la fracción soluble nuclear.

En la fracción citoplasmática (fig. 3) se observan dos picos de actividad a los que se designó C_{In} y C_{IIIn} .

El pico C_{In} eluye alrededor de 0.07M de ClNa y el pico C_{IIIn} a una molaridad de alrededor de 0.13M de ClNa.

Por otro lado la fracción soluble nuclear muestra un sólo pico de actividad al que se lo designó como N_{In} que no es adsorbido en DE52 (fig. 4).

Las técnicas usadas para la cromatografía, así como la determinación de la actividad enzimática fueron descritas en Materiales y Métodos.

ADN polimerasas de linfocitos estimulados por PHA

La fracción citoplasmática y el extracto soluble nuclear de linfocitos estimulados también fueron cromatografiados en columnas de celulosa DE52.

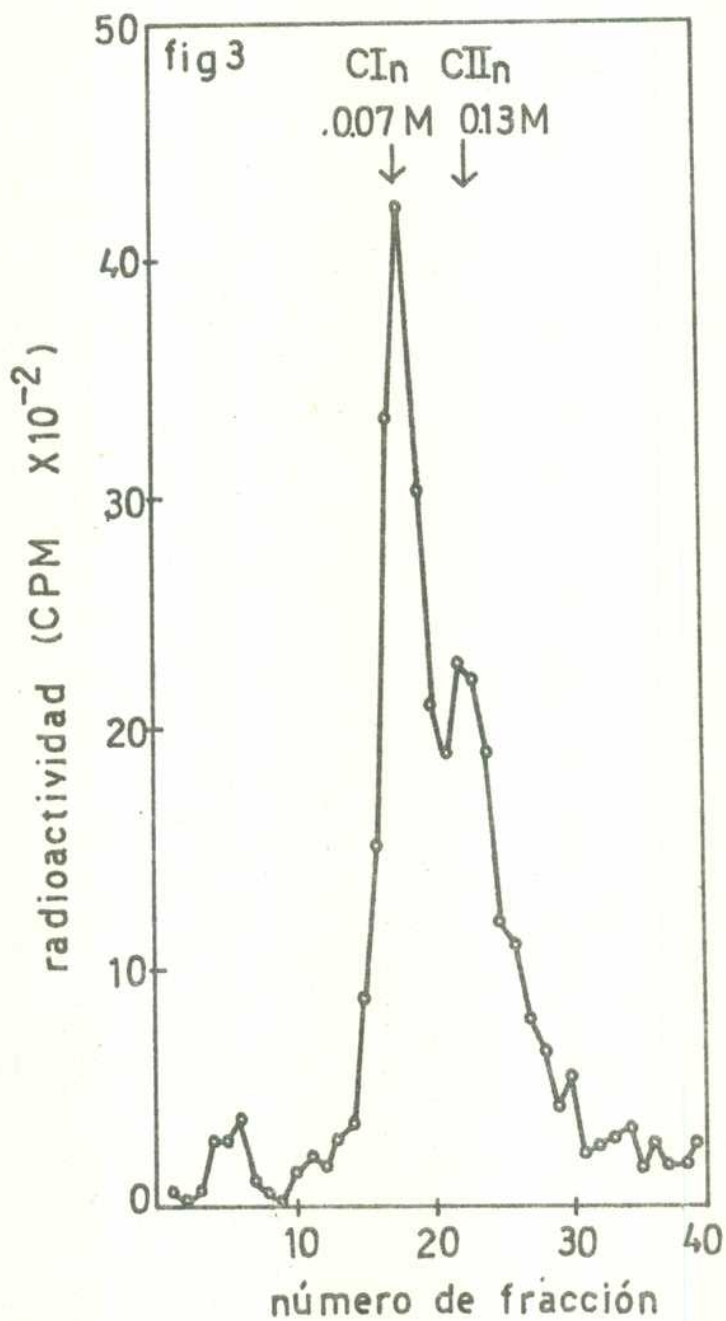
En la fracción citoplasmática (fig. 5) se observa un sólo pico de actividad designado por C_{Is} que eluye a una concentración de 0.12M de ClNa. En cambio la fracción soluble nuclear (fig. 6) presenta dos picos de actividad designados por N_{Is} y N_{IIIs} .

En forma semejante a lo que ocurre con la fracción soluble

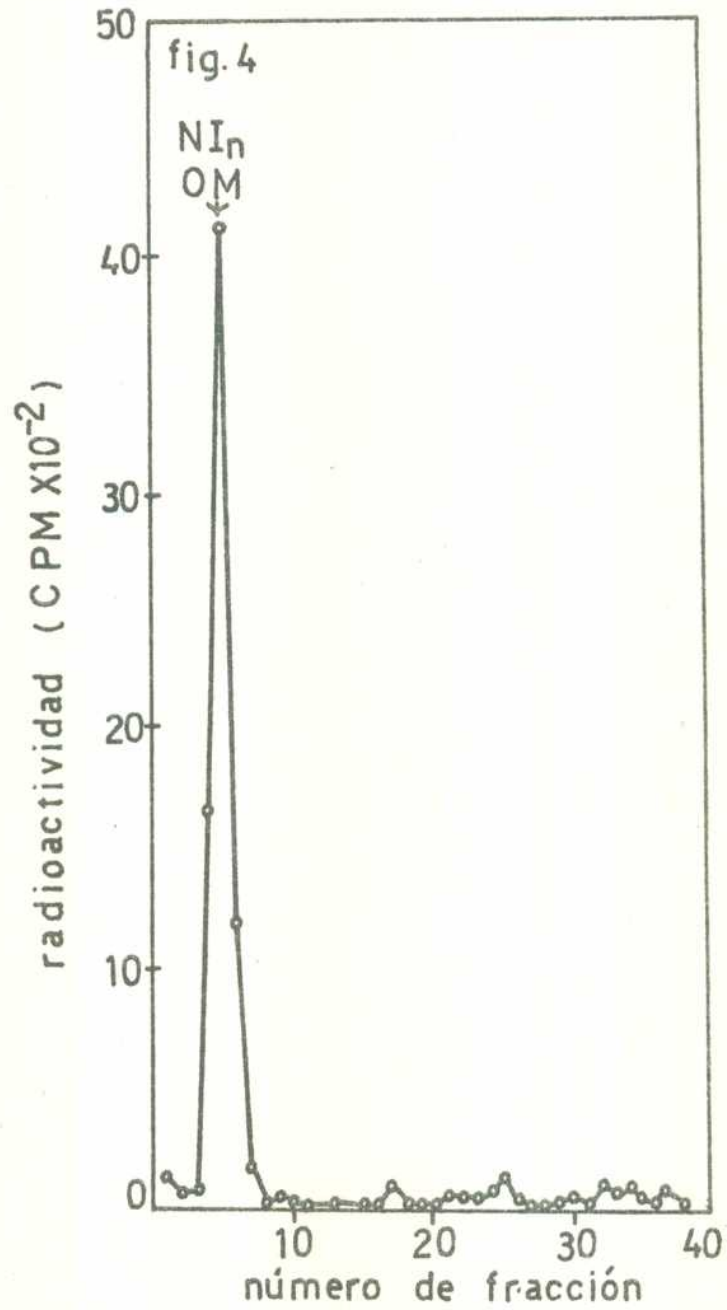
nuclear de linfocitos no estimulados el pico N_{I_s} no se adsorbe a la DE52. Pero en el caso de linfocitos estimulados aparece un segundo pico que es mayor que el N_{I_s} y que eluye a una molaridad de alrededor de 0.07M de ClNa.

La determinación de la actividad de la ADN polimerasa así como las técnicas usadas para las columnas de celulosa DE52 se describieron ya en Materiales y Métodos.

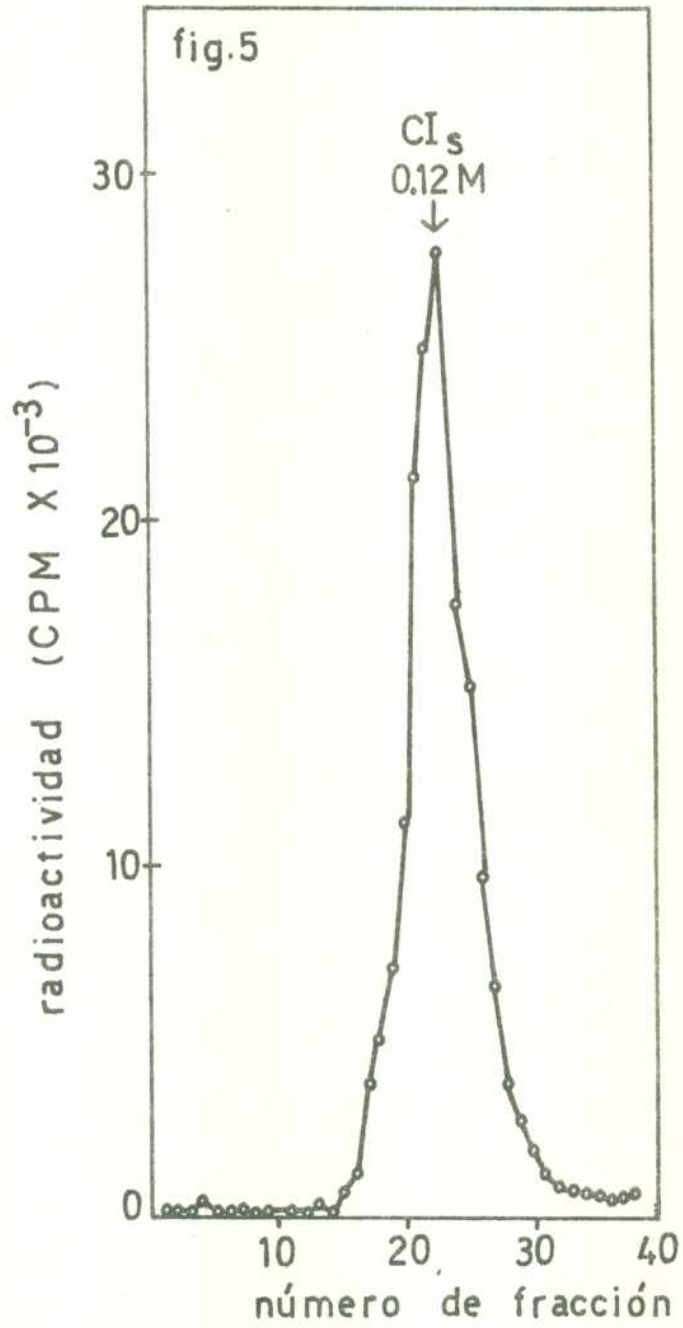
Actividad de la ADN polimerasa ADN dependiente de la
fracción citoplasmática de linfocitos no estimulados



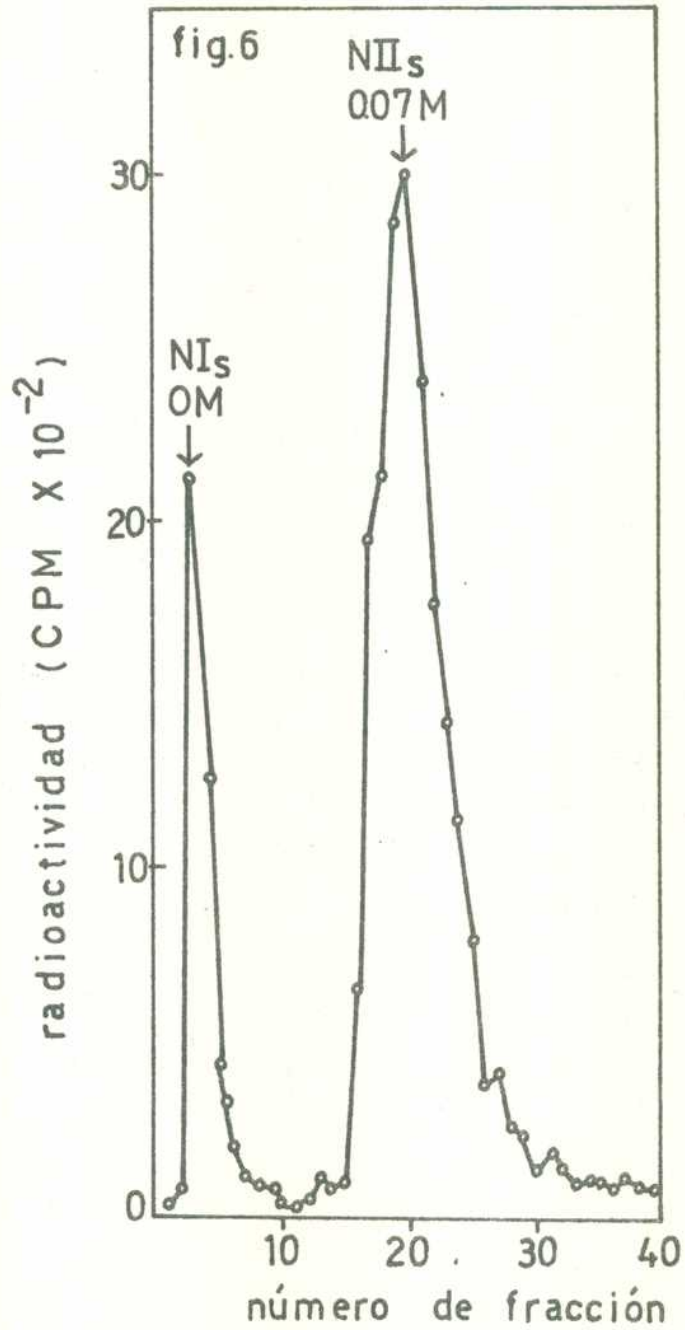
Actividad de la ADN polimerasa ADN dependiente en la fracción soluble nuclear de linfocitos no estimulados



Actividad de la ADN polimerasa ADN dependiente en la fracción citoplasmática de linfocitos estimulados por PHA



Actividad de la ADN polimerasa ADN dependiente en la fracción soluble nuclear de linfocitos estimulados por PHA



Leyenda correspondiente a las Fig. 3, 4, 5 y 6: Para la preparación de los extractos citoplasmáticos y nucleares de linfocitos estimulados y sin estimular se partió en cada caso de aproximadamente 600×10^6 linfocitos. La estimulación se llevó a cabo durante 72 horas a 37°C . Las distintas fracciones subcelulares se obtuvieron como se describe en Materiales y Métodos.

Se usó una columna Pharmacia (0.9 x 13.5 cm) y se la cargó hasta un volumen de 7.6 ml con celulosa DE52. Se recogen 40 fracciones de 1.5 ml cada una, en tubos conteniendo 50λ de BSA 9 mgr/ml. La actividad de la ADN polimerasa de cada fracción se ensayó según se explica en Materiales y Métodos.

Propiedades de las ADN polimerasas de
linfocitos estimulados y sin estimular

Para realizar estos estudios se usaron los picos de actividad obtenidos después de la cromatografía en celulosa DE52.

Dada la importancia de poder diferenciar las distintas ADN polimerasas que aparecen en el núcleo y citoplasma de linfocitos no estimulados y estimulados por PHA se observaron las propiedades de las polimerasas y los requerimientos para la determinación de la actividad enzimática.

En la tabla III se observa que algunas propiedades de las enzimas N_I ya sea de linfocitos estimulados o sin estimular son diferentes a las observadas para las otras enzimas, por ejemplo en sus requerimientos de BSA (albúmina de suero bovino), dependencia a las sales y en su pH óptimo. Por otro lado las enzimas C_{In} , C_{IIIn} , y C_{Is} tienen propiedades similares.

También fueron estudiados los requerimientos de sustrato para las ADN polimerasas (Tabla IV). Para ello se usaron los picos de actividad obtenidos después del pasaje por columnas de celulosa DE52 y la actividad de la enzima se determinó por el método habitual.

En esta tabla también puede observarse la similitud entre las enzimas N_I de linfocitos estimulados y sin estimular, en cuanto a que la máxima incorporación de (3H)TTP no depende de la presencia de los otros deoxinucleósidos trifosfatos, cosa que no ocurre con las enzimas C_{In} , C_{IIIn} , C_{Is} y N_{IIIs} . Por último también se observa en la tabla IV que todas las enzimas prefieren ADN activado respecto

al ADN nativo y al ADN desnaturalizado por calor. El producto de la reacción en todos los casos es sensible a la acción de la DNasa pero no a la de la enzima RNasa.

Tabla III

Requerimientos para la reacción de la ADN polimerasa

Condiciones	Enzima (% de actividad)					
	C_{In}	C_{IIIn}	N_{In}^{***}	C_{Is}	N_{Is}^{***}	N_{IIIs}
Completo	100	100	100	100	100	100
Sin Mg^{++} , agregando 0.5 mM, Mn^{++}	10	12	28	53	41	61
Sin BSA	37	43	86	5	92	3
Sin DTT*	36	73	66	26	55	29
ClK 0.2M	38	33	102	13	139	32
o-fenantrolina** 1mM	36	35	68	84	74	59
2.5mM	16	17	37	59	27	29

* Al agregar los 20 λ de enzima que contienen DTT, hacen a la mezcla de reacción 0.2mM en DTT.

** La inhibición por o-fenantrolina se midió con 12.5 μ gr de ADN activado y 10mM de Cl_2Mg .

*** Los requerimientos de N_{In} y N_{Is} se probaron a ph 9, y 0.2M de ClK.

La determinación de la actividad de la ADN polimerasa se describe en Materiales y Métodos.

Tabla IVRequerimientos de sustrato para la ADN polimerasa

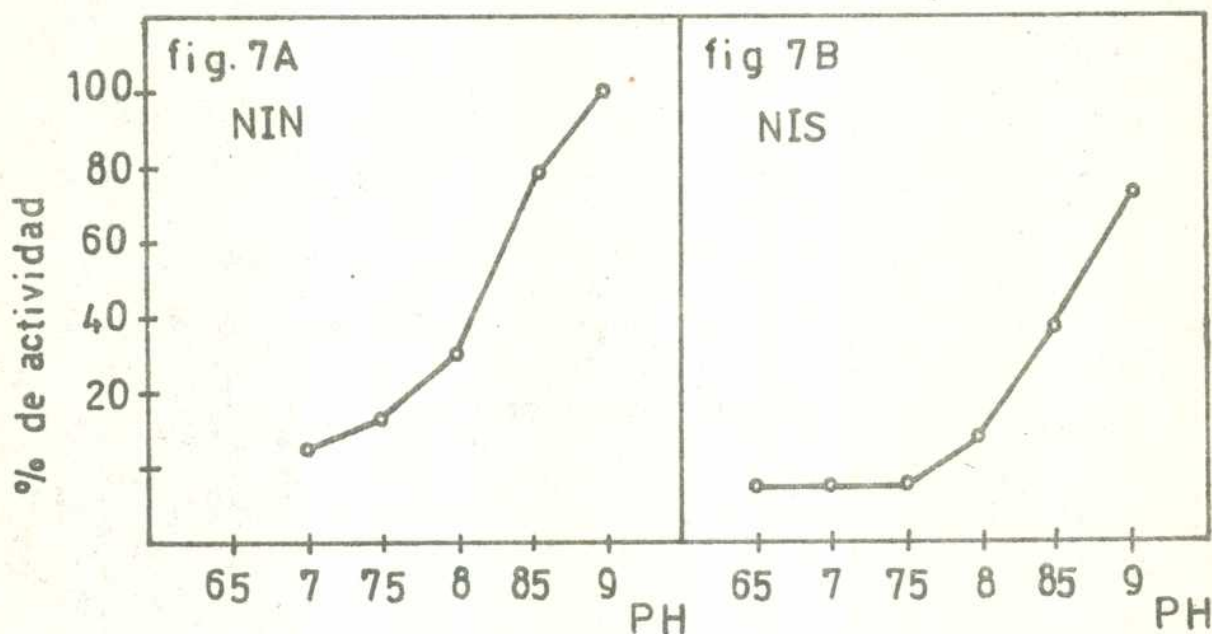
Condiciones	Enzima (% de actividad)					
	C _{In}	C _{IIn}	N _{In}	C _{Is}	N _{Is}	N _{IIs}
Completo	100	100	100	100	100	100
Sin ADN activado agregando ADN nativo (62 µgr)	17	13	29	3	19	10
Sin ADN activado agregando ADN calentado (62 µgr)	0	0	0	0	8	0
Sin dATP, dCTP, dGTP	20	26	93	22	122	34
DNAsa (10 µgr/ml)	16	20	15	1	1	4
RNAsa (200 µgr/ml)	108	99	104	100	98	106
1mM ATP	81	78	94	125	113	79

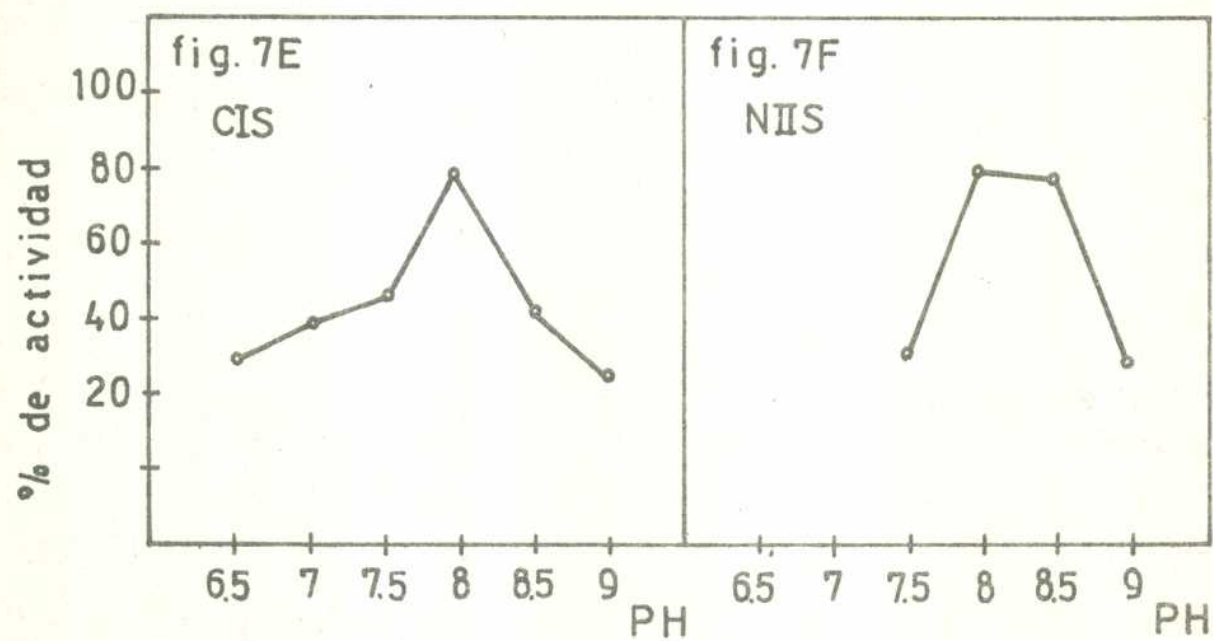
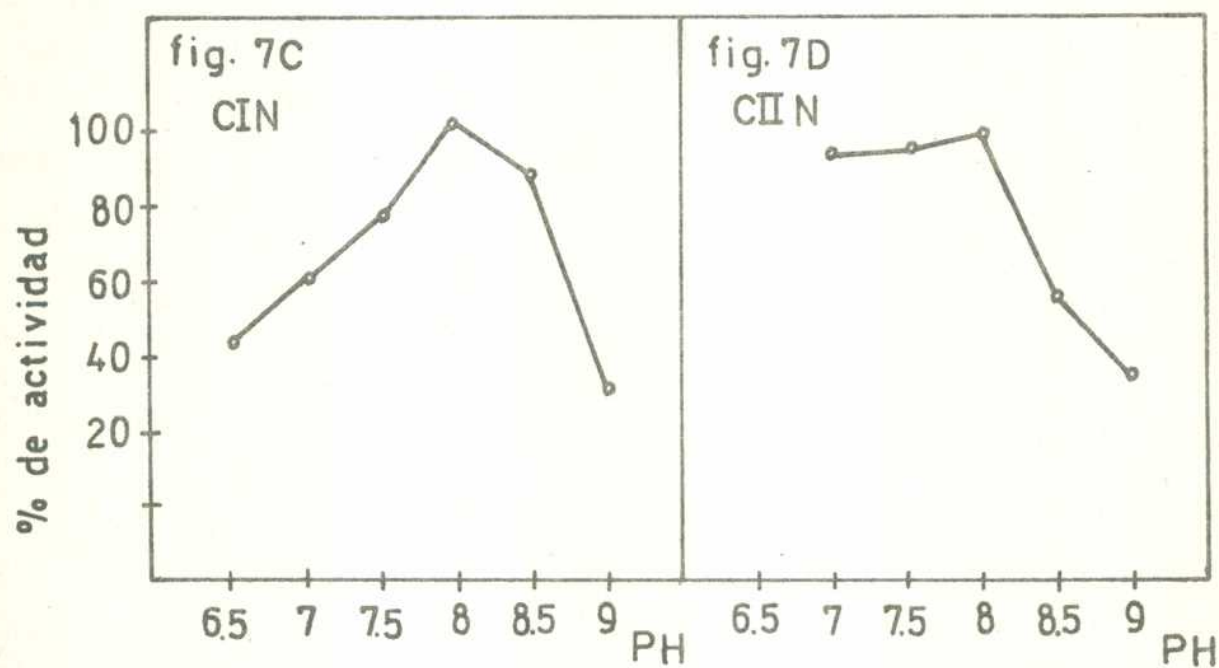
Los métodos y condiciones usadas son las mismas descritas en la Tabla III.

Efecto del ph sobre la actividad de las ADN polimerasas de
linfocitos sin estimular y estimulados por PHA

Este estudio fue hecho con las enzimas purificadas por columnas de celulosa DE52. Se observa en la fig. 7 que el ph óptimo para las enzimas citoplasmáticas C_{Is} , C_{In} , C_{IIn} , de linfocitos estimulados y sin estimular es 8 y lo mismo ocurre con la enzima nuclear N_{IIs} . En cambio la actividad de las enzimas nucleares N_{Is} y N_{In} aumenta por lo menos hasta 9.

Rutinariamente los ensayos con estas enzimas fueron hechos a ph 9. Esto último es debido a que los buffers usados para obtener un ph por arriba de 9 fueron inhibitorios con respecto al bufer Tris-ClH. La determinación de la actividad de la ADN polimerasa se describe en Materiales y Métodos.





Determinación del peso molecular de las ADN polimerasas de
linfocitos no estimulados y estimulados por PHA

Otra de las propiedades importantes que nos permiten diferenciar las distintas ADN polimerasas es el PM. Para determinarlo se usaron gradientes de sacarosa y cromatografía por Sephadex G150. En los ensayos se usaron las enzimas purificadas por celulosa DE52 y los métodos empleados fueron ya descriptos en Materiales y Métodos.

En el caso de las enzimas N_{In} y N_{Is} la actividad se determinó a pH 9 y con una concentración de ClK de 0.2M.

Gradientes de sacarosa de las ADN polimerasas de
linfocitos estimulados y sin estimular

Para la determinación de los pesos moleculares de estas enzimas se usaron como proteínas de referencia la alcohol deshidrogenasa de levadura (AD) de PM = 150.000, la fosfatasa alcalina (AP) de E. Coli de PM = 80.000, y la peroxidasa de rabanito (Pe) de PM = 44.000.

La fig. 8 muestra los perfiles de sedimentación de las enzimas citoplasmáticas y nucleares de linfocitos estimulados y sin estimular.

La fig. 8 A corresponde a la enzima citoplasmática C_{In} de linfocitos no estimulados. Se observan fundamentalmente dos picos, uno que corresponde a un PM de aproximadamente 300.000 daltons y otro de alrededor de los 50.000 daltons.

En la fig. 8 B perteneciente a la enzima citoplasmática C_{IIn} de linfocitos no estimulados se observan dos picos, que correspon-

den a pesos moleculares de aproximadamente 300.000 daltons y 50.000 daltons.

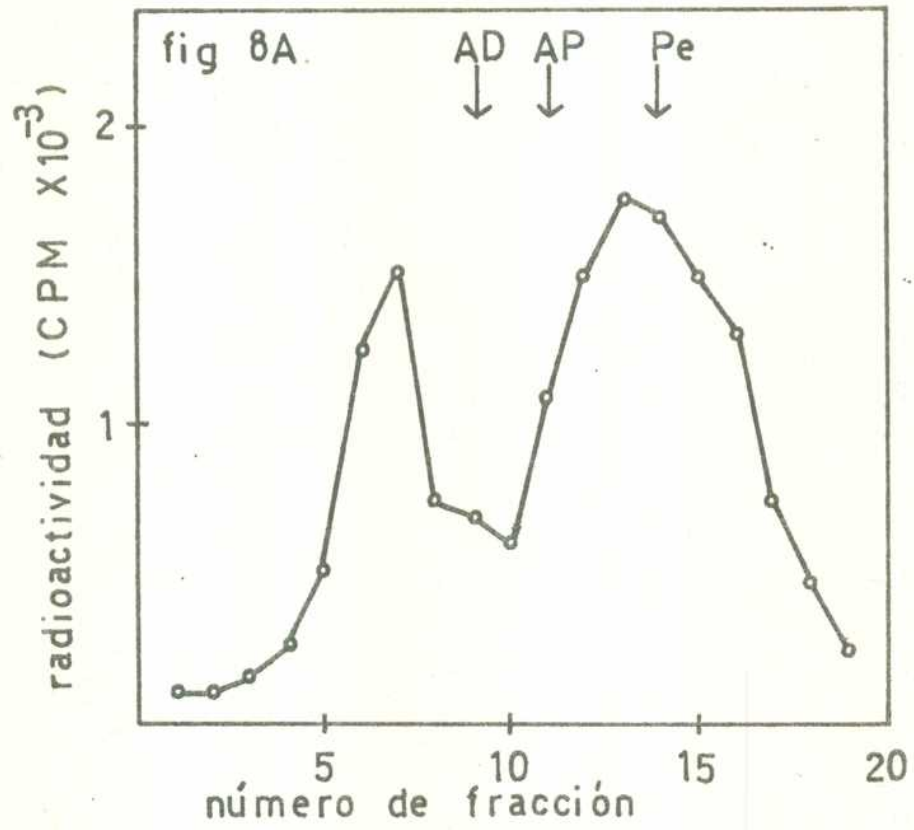
La Fig. 8 C pertenece a la enzima nuclear N_{In} de linfocitos no estimulados y muestra un sólo pico que corresponde a un PM entre los 20.000 y 40.000 daltons.

Por otro lado en las figuras 8 D, 8 E y 8 F se observan los perfiles de sedimentación de las enzimas C_{Is} , N_{Is} y N_{IIs} de linfocitos estimulados.

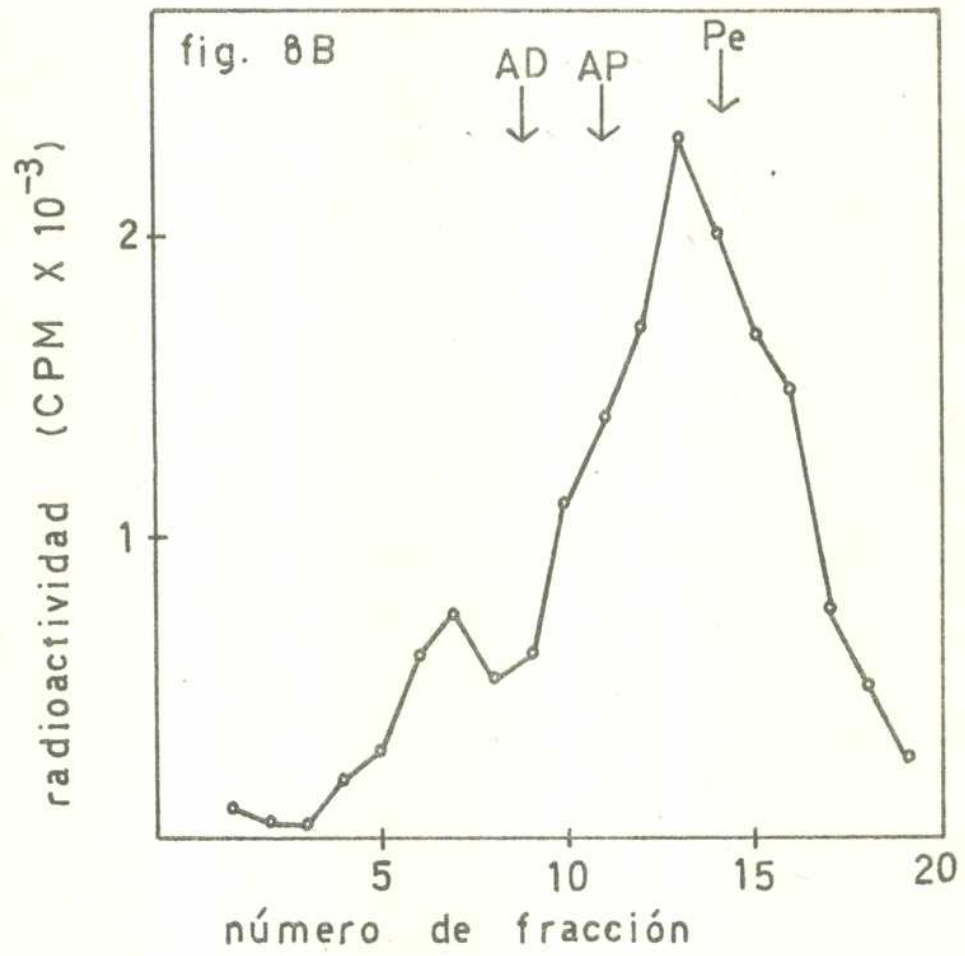
En la fig. 8 D (C_{Is}) se observan dos picos, uno en la zona de los PM de 300.000 daltons aproximadamente y otro en la zona de los 40.000 daltons.

En el perfil de sedimentación perteneciente a la enzima nuclear N_{Is} (fig. 8 E) aparece un sólo pico que corresponde a un PM de 40.000 y en el de la enzima nuclear N_{IIs} (fig. 8 F) aparecen dos picos que están en las zonas de pesos moleculares de 200.000 daltons y 50.000 daltons respectivamente.

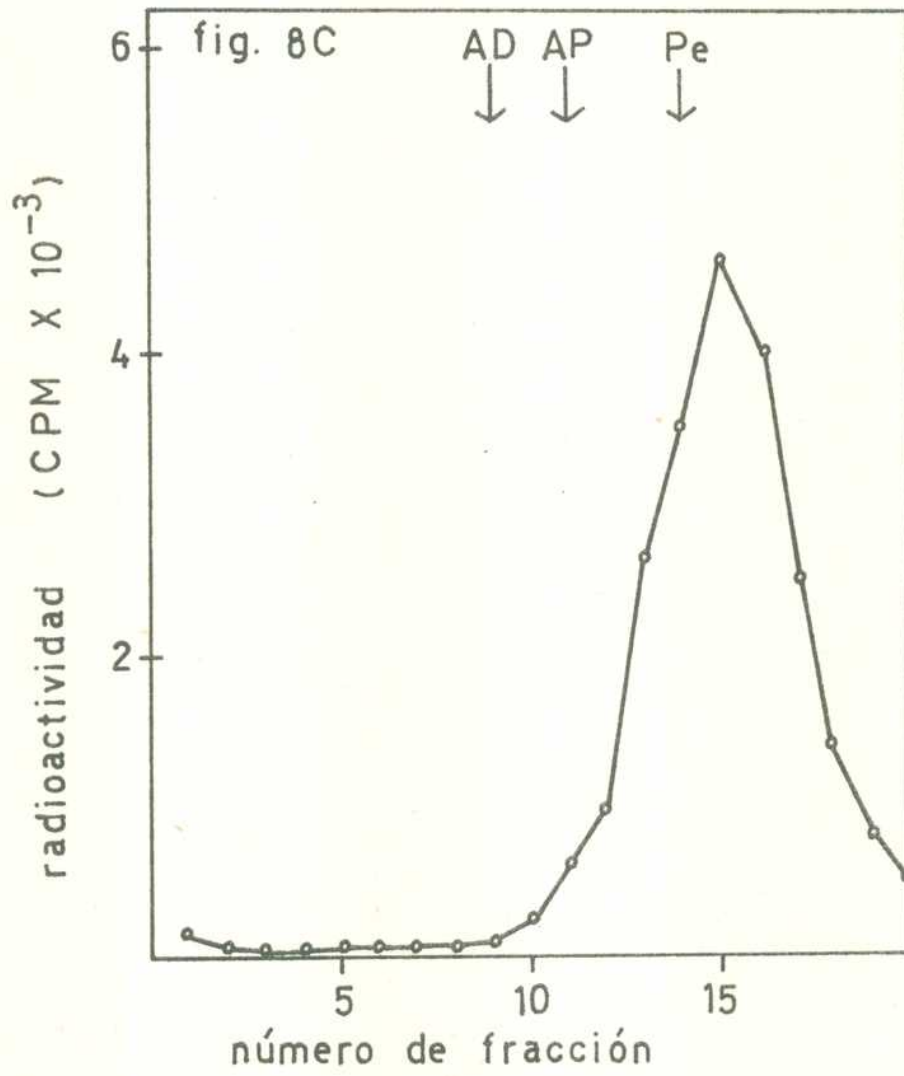
Gradiente de sacarosa de la enzima C_{In}



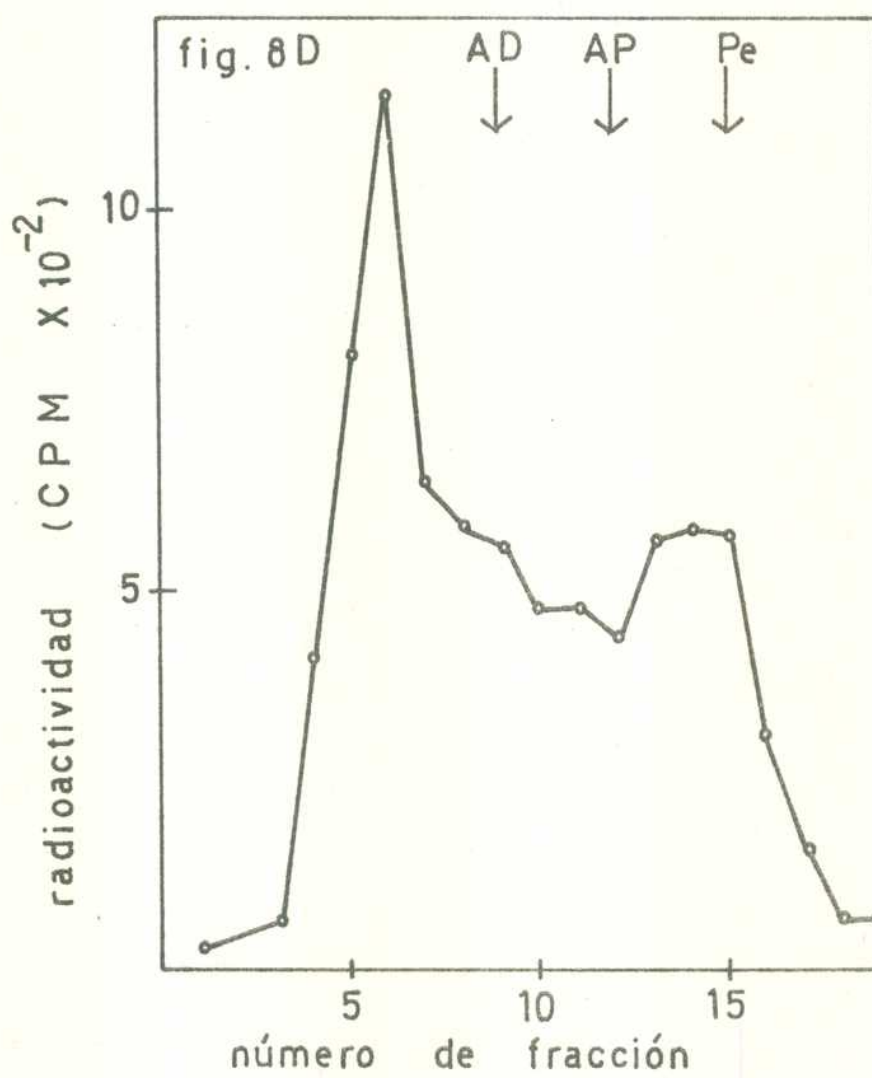
Gradiente de sacarosa de la enzima C_{IIIn}



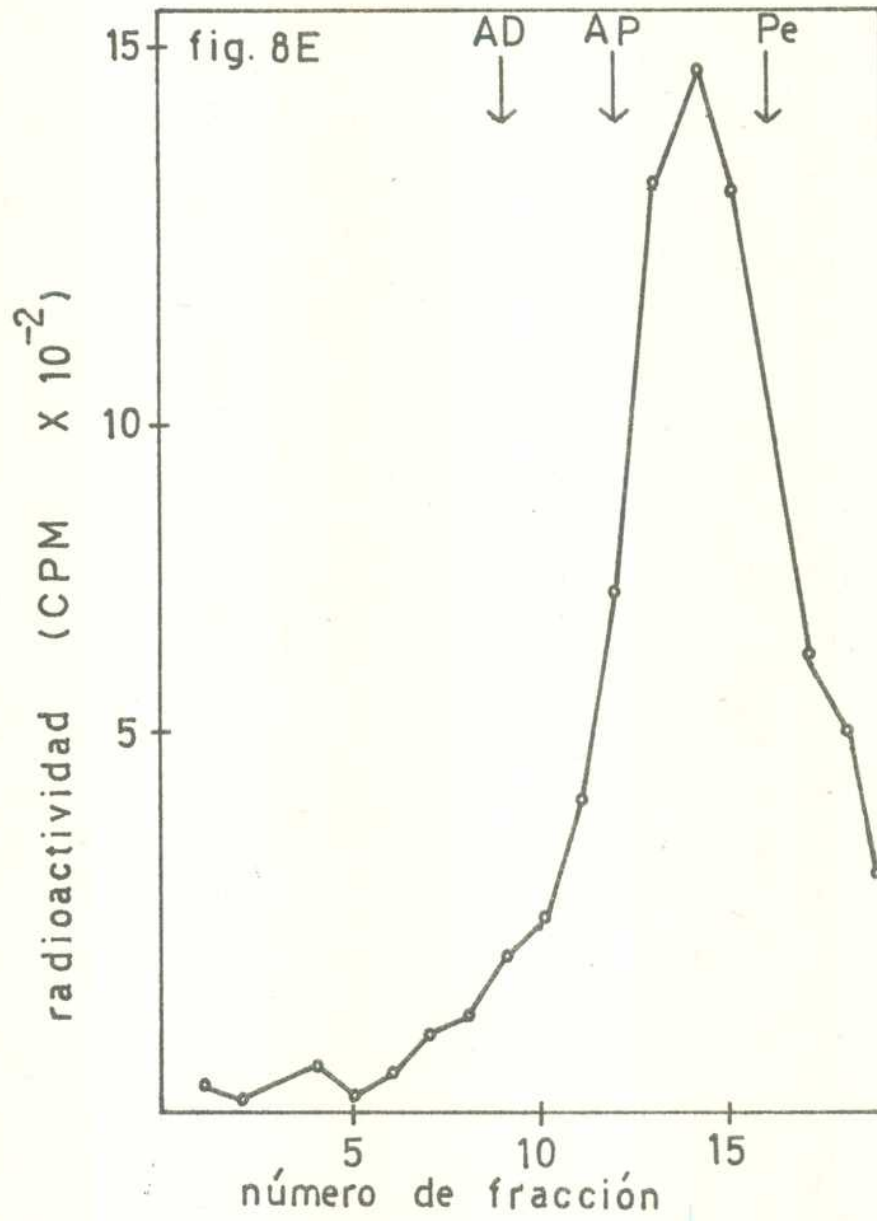
Gradiente de sacarosa de la enzima N_{In}



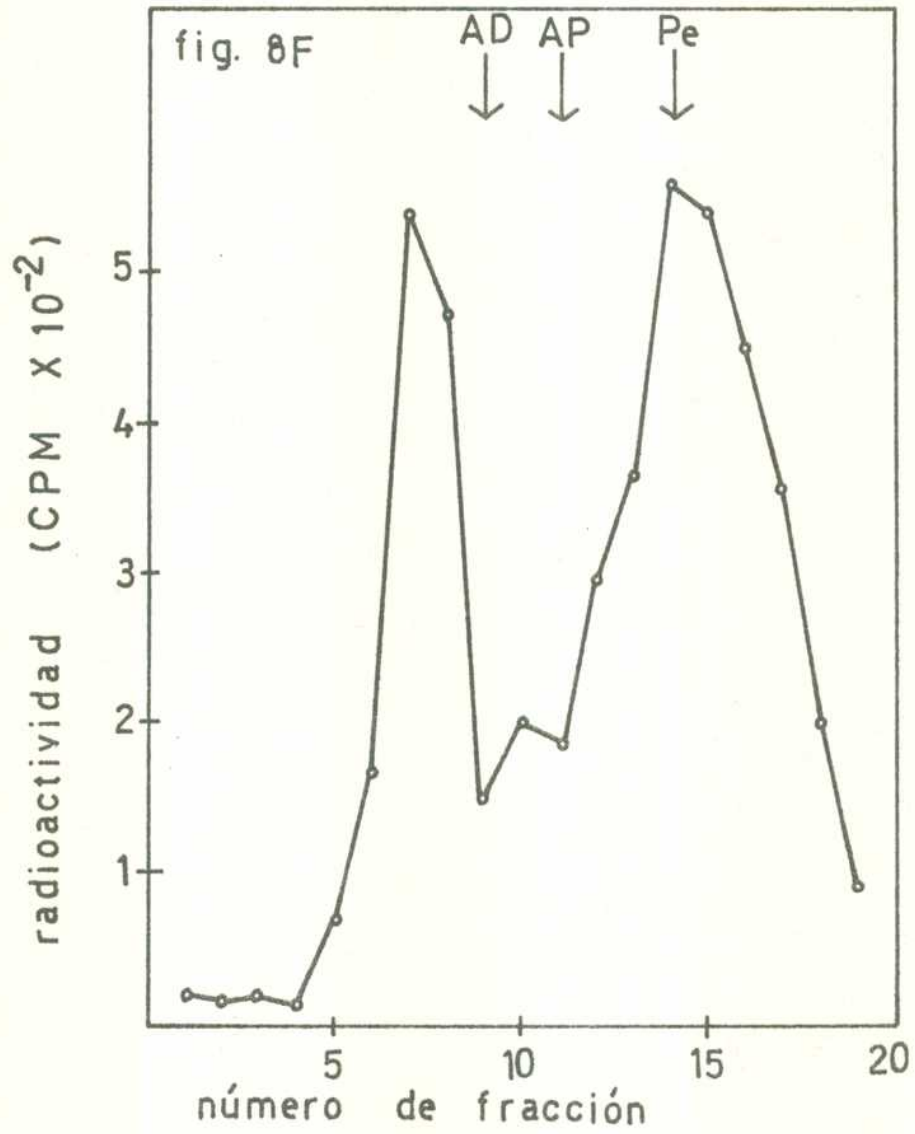
Gradiente de sacarosa de la enzima C_{1s}



Gradiente de sacarosa de la enzima N_Is



Gradiente de sacarosa de la enzima N_{II}s



Leyenda correspondiente a la Fig. 8: Perfiles de sedimentación en sacarosa de extractos citoplasmáticos y nuclear de linfocitos estimulados y sin estimular.

En todos los casos se usaron los picos de actividad de las columnas de DE52. Se dializaron contra TEDG y se concentraron con Ficoll. Cada muestra se sembró sobre un gradiente 10%-30% de sacarosa en TED, junto con las proteínas de referencia externas. Se corrieron durante 15 horas a 40.000 rpm en un rotor Spinco SW65 a 5° C. La actividad de la ADN polimerasa se determinó según se especifica en Materiales y Métodos.

- Fig. 8 A. Enzima C_{In} citoplasmática de linfocitos sin estimular.
- Fig. 8 B. Enzima C_{IIn} citoplasmática de linfocitos sin estimular.
- Fig. 8 C. Enzima N_{In} nuclear de linfocitos sin estimular.
- Fig. 8 D. Enzima C_{Is} citoplasmática de linfocitos estimulados.
- Fig. 8 E. Enzima N_{Is} nuclear de linfocitos estimulados.
- Fig. 8 F. Enzima N_{IIs} nuclear de linfocitos estimulados.

Cromatografía en Sephadex G150 de las ADN polimerasas
de linfocitos estimulados y sin estimular

Para la determinación de los PM de estas enzimas en este método se usaron como proteínas de referencia la albúmina de suero bovino (SAB) de PM = 67.000, la peroxidasa de rábano (Pe) de PM = 44.000 y el citocromo C de músculo de corazón de caballo (C) de PM = 13.000. Se hizo una curva patrón de pesos moleculares (fig. 9). Para ello se corrieron en una columna de Sephadex G150, como se describe en Materiales y Métodos las tres sustancias de referencia.

Para medir el PM de las ADN polimerasas se usaron las enzimas purificadas por celulosa DE52. Los resultados se observan en la fig. 10.

La enzima nuclear N_{I_8} de linfocitos estimulados no pudo cromatografiarse por falta de material.

La cromatografía correspondiente a las enzimas de linfocitos no estimulados están representadas en las fig. 10 A, 10 B y 10 C.

La primera de ellas pertenece a la enzima C_{I_n} y presenta tres picos que corresponden a un PM de 150.000 o mayor, otro de aproximadamente 40.000 daltons y otro de 13.000 daltons.

La fig. 10 B correspondiente a C_{II_n} presenta dos picos en las zonas de PM 120.000 y 13.000 y la fig. 10 C que pertenece a la enzima N_{I_n} presenta un solo pico en la zona de pesos moleculares de 60.000 daltons.

La enzima citoplasmática C_{I_s} fig. 10 D muestra dos picos, uno que corresponde a un PM mayor de 150.000 y otro a un PM de aproximadamente 120.000.

La enzima N_{II_s} fig. 10 E tiene dos picos que corresponden a pesos moleculares, uno mayor de 150.000 y otro de aproximadamente 10.000 y también existe una zona que podría corresponder a una enzima de $PM = 90.000$ (entre el tubo 12 y 16).

Curva patrón de pesos moleculares en Sephadex G150 (Pharmacia)

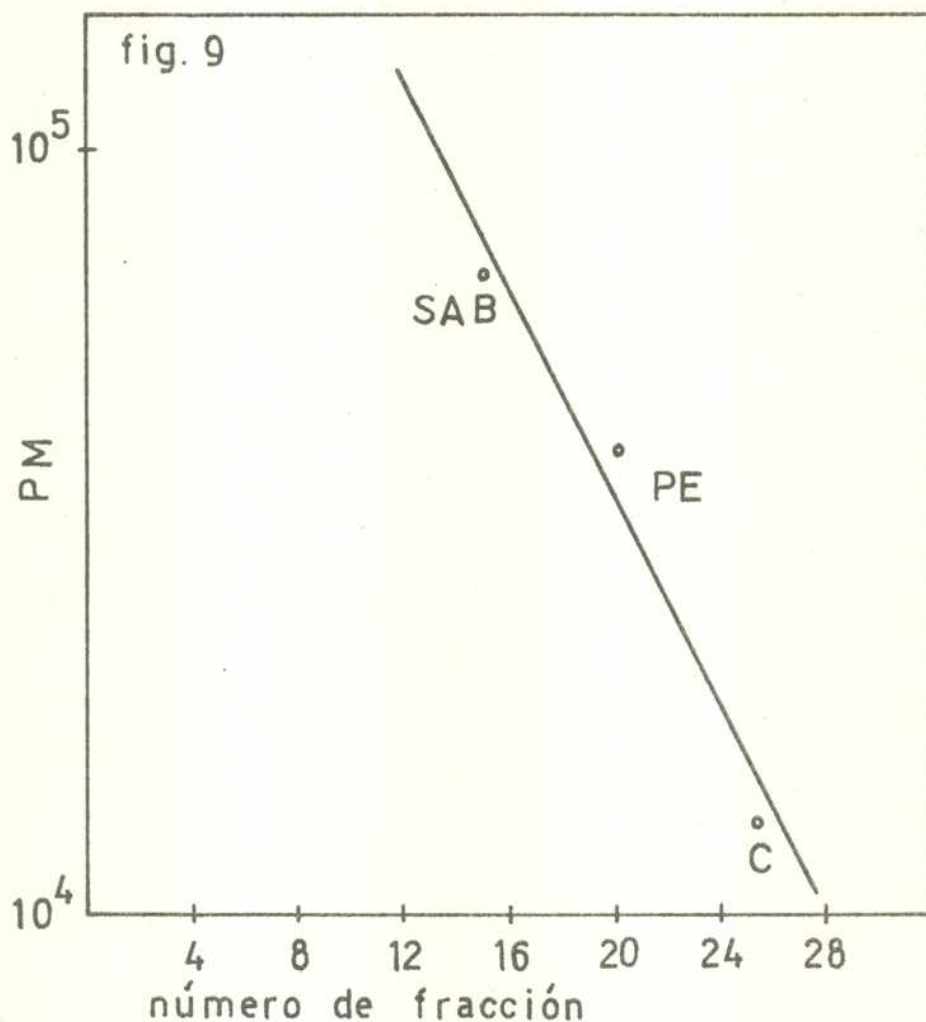
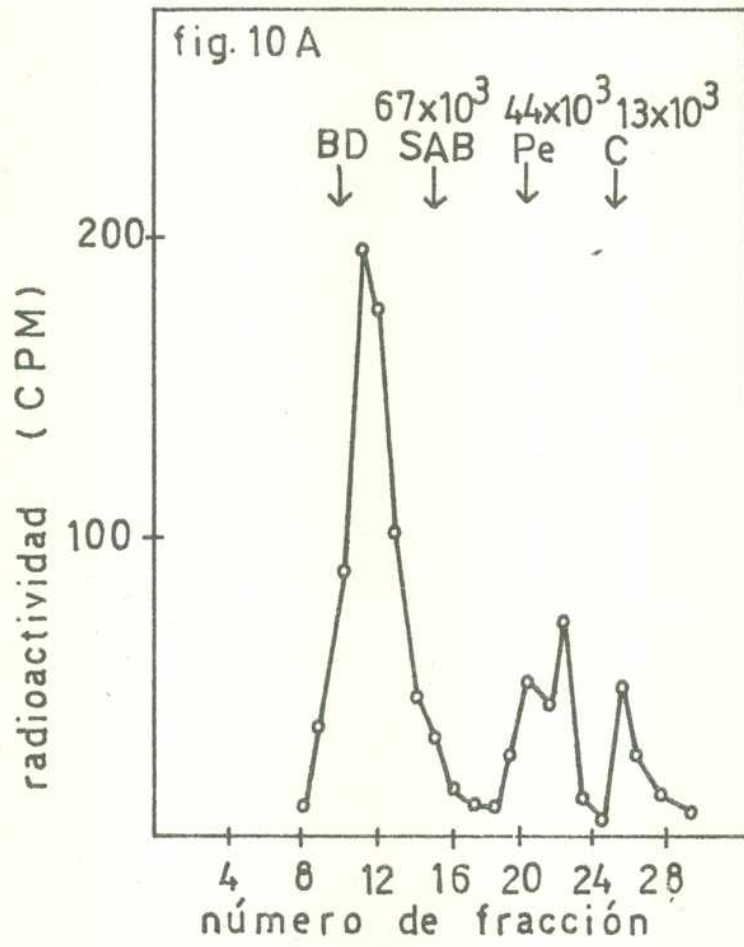
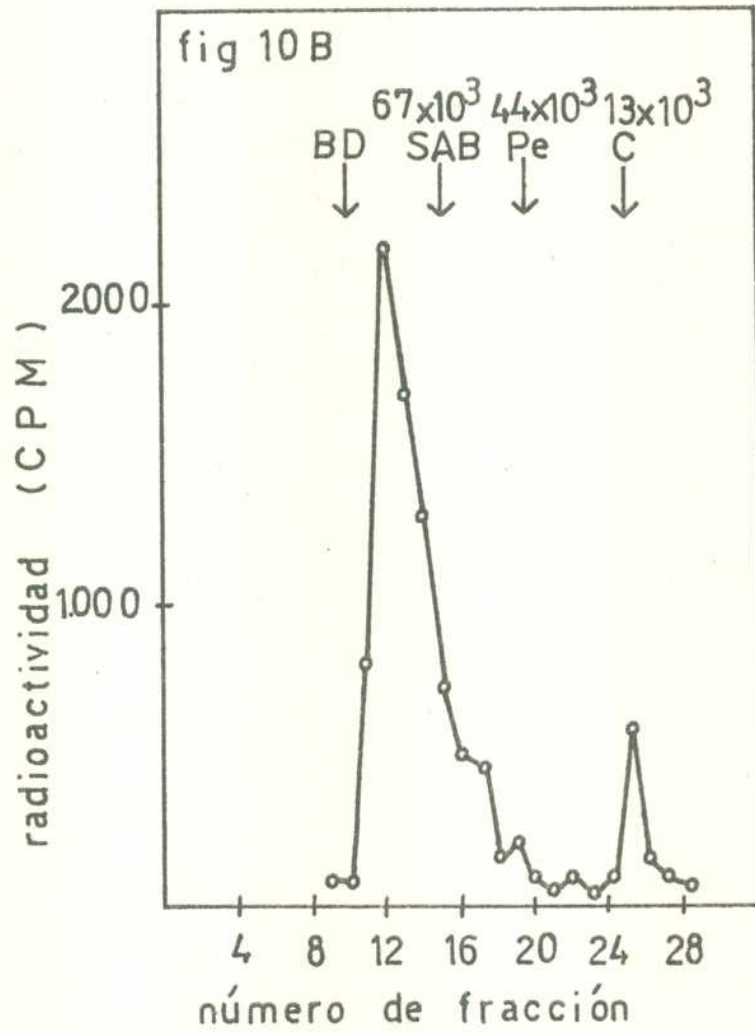


Fig. 9: Se cargó una columna (0.9 x 19 cm) con 12 ml de Sephadex G150. Se determinó el volumen muerto de la columna con una solución de Blue dextran. Luego se calibra con albúmina de suero bovino SAB (PM=67.000), con peroxidasa de rabanito Pe (PM=44.000) y con citocromo C (PM=13.000). La determinación de Blue dextran, SAB, C y la actividad de la peroxidasa se describen en Materiales y Métodos.

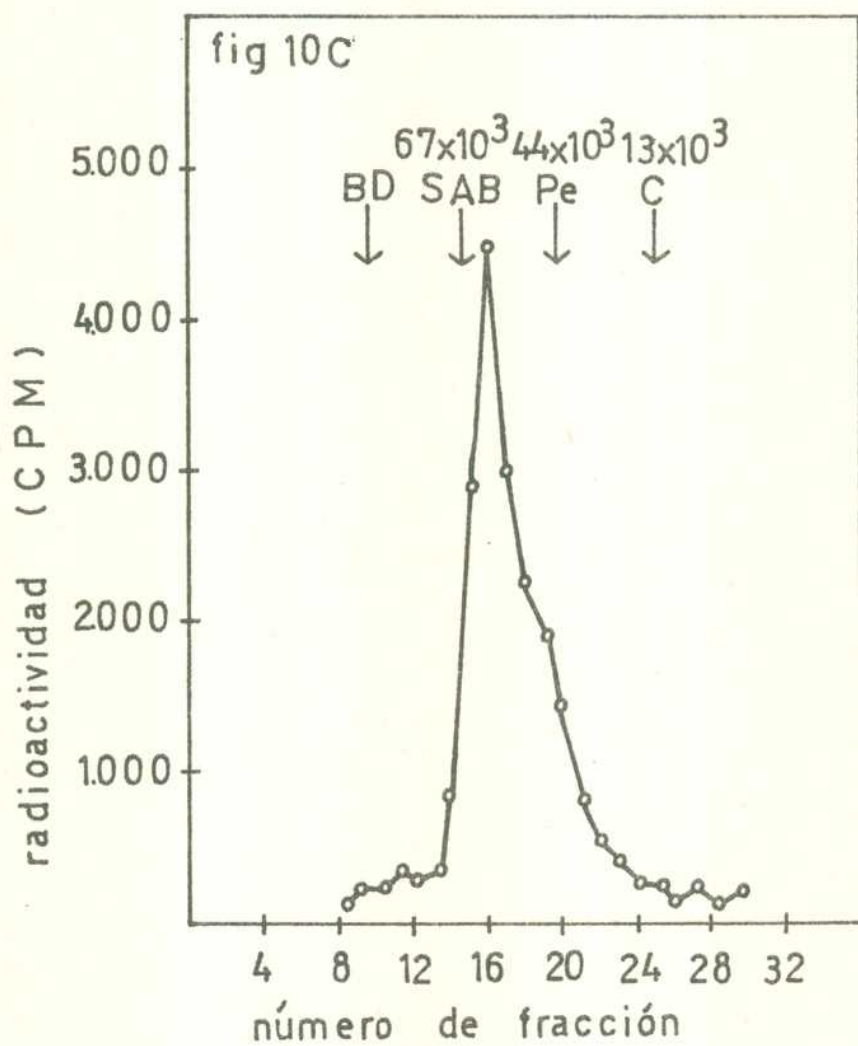
Cromatografía en Sephadex G150 de la enzima C_{In}

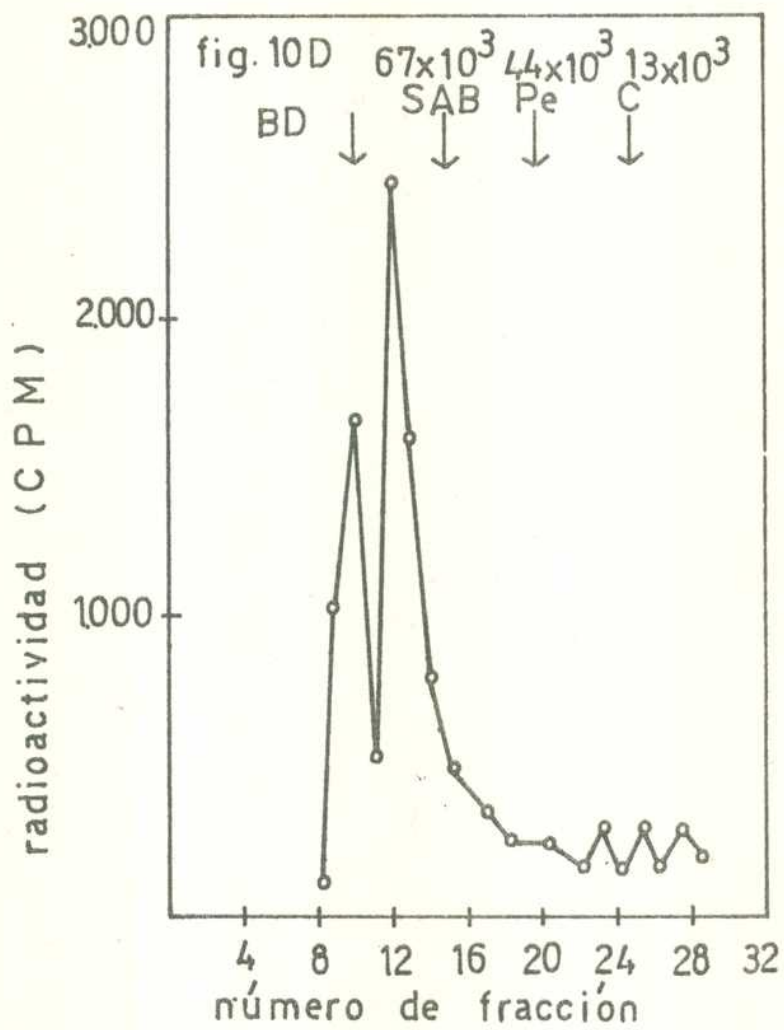


Cromatografía en Sephadex G150 de la enzima C_{II}n

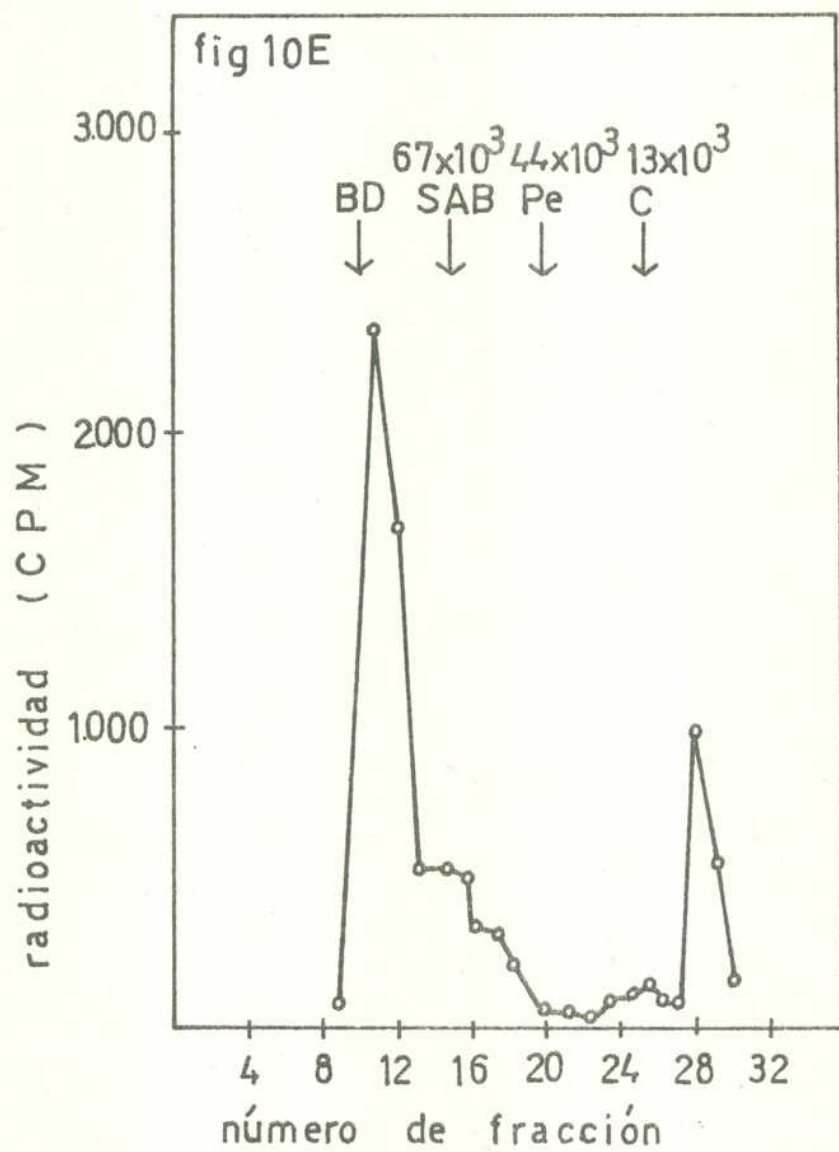


Cromatografía en Sephadex G150 de la enzima N_In



Cromatografía en Sephadex de la enzima C_{1s}

Cromatografía en Sephadex de la enzima N_{II}s



Leyenda correspondiente a la Fig. 10: Cromatografía en Sephadex G150 de las ADN polimerasas de las fracciones citoplasmáticas y nucleares de linfocitos estimulados y sin estimular.

Se usaron los picos de actividad de las columnas de celulosa DE52 después de ser dializados y concentrados por Ficoll.

V_0 es el volumen muerto medido con Blue dextran. La actividad de la ADN polimerasa se midió según se describe en Materiales y Métodos.

Fig. 10 A. Cromatografía de la enzima C_{In} citoplasmática de linfocitos sin estimular.

Fig. 10 B. Cromatografía de la enzima C_{IIn} citoplasmática de linfocitos sin estimular.

Fig. 10 C. Cromatografía de la enzima N_{In} nuclear de linfocitos sin estimular.

Fig. 10 D. Cromatografía de la enzima C_{Is} citoplasmática de linfocitos estimulados.

Fig. 10 E. Cromatografía de la enzima N_{IIs} nuclear de linfocitos estimulados.

DISCUSIÓN

Se estudiaron las características y distribución de las ADN polimerasas de linfocitos sin estimular y estimulados por PHA.

Con respecto a la distribución subcelular de las ADN polimerasas (Tablas I y II), es posible observar dos hechos fundamentales:

- 1) La actividad específica de la enzima aumenta en las diferentes fracciones luego de la estimulación con PHA.
- 2) Las diferentes fracciones subcelulares contienen porcentajes aproximadamente iguales de la enzima en los linfocitos estimulados o sin estimular.

Como ocurre en otros tipos de células de eucariotes, la mayor parte de la actividad de la ADN polimerasa se encuentra en el extracto citoplasmático (54-57-161-162). Este hecho ha suscitado dudas sobre la función de la ADN polimerasa citoplasmática, ya que se creía en un principio que los procesos de replicación del ADN estaban restringidos al núcleo, donde se encuentra la cromatina. Se sugirió que la ADN polimerasa estaba en el citoplasma, por haber sido recién sintetizada y aún no transportada al núcleo, o bien se debía a que el núcleo perdía parte de esta enzima cuando se rompía la célula.

Herrick, Spear y Veomett (163) reexaminaron la localización intracelular de la ADN pol α usando citocalasina B y centrifugación. Esta técnica evita la lisis celular durante la separación del núcleo y el citoplasma, pudiendo separar por centrifugación citoplastos y carioplastos metabólicamente activos e intactos. Sus resultados indicaron que más del 85% de la actividad total de ADN pol α (y ADN pol β) está en el núcleo. Sin embargo los reticulocitos de conejo (164), que son células anucleadas, también tienen esta enzima.

El hecho de que la distribución subcelular de la actividad total sea muy similar en ambos tipos de linfocitos estaría en desacuerdo con observaciones hechas en otras células de eucariotes (118-46-47), aunque para poder comparar estos datos con los obtenidos en otros tejidos debería observarse la distribución subcelular en las distintas fases del ciclo celular.

Craig, Costello y Keir (73) trabajando con cultivos de células BHK que crecían exponencialmente observaron un aumento en la actividad de la polimerasa asociada con el núcleo y una disminución de esta actividad a medida que la velocidad de síntesis del ADN disminuye al final de la fase S. En el citoplasma, por otro lado la actividad de la polimerasa nuclear ha comenzado a decrecer.

Chang et al. (80) y Lindsay et al. (165) encontraron una situación similar en cultivos de células L y Fansler y Loeb (46-47) observaron este fenómeno en embriones de erizo de mar.

Se decidió profundizar este estudio analizando la variedad de ADN polimerasas existentes en el extracto citoplasmático, por ser

el que tiene la mayor cantidad de enzima y en el extracto nuclear, porque en el mismo es donde se lleva a cabo el proceso de replicación cromosómica.

Del análisis de los extractos citoplasmáticos y nucleares de linfocitos estimulados y sin estimular provenientes de la cromatografía en DE52 (fig. 3, 4, 5 y 6) se observaron básicamente las siguientes características:

- 1) La presencia de dos picos de ADN polimerasas citoplasmáticas (C_{In}) y (C_{IIn}) en los linfocitos no estimulados, contra sólo uno (C_{Is}) en los estimulados.
- 2) La presencia en ambos extractos nucleares del pico N_I .
- 3) La aparición de un segundo pico de actividad (N_{IIs}) en el núcleo de células estimuladas.

A partir de estas observaciones pueden plantearse varios interrogantes:

- a) ¿Cómo podría explicarse la existencia de dos picos de polimerasa citoplasmática en los linfocitos no estimulados y de sólo uno en el estimulado?
- b) ¿La aparición de pico nuclear N_{IIs} podría explicarse por un fenómeno de transporte de la enzima desde el citoplasma al núcleo? ¿Requiere síntesis neta de enzima?

Con respecto a las diferencias entre las enzimas citoplasmáticas de los linfocitos no estimulados y los estimulados por PHA se puede suponer que C_{In} y C_{IIn} están presentes en distintos tipos de linfocitos. Se sabe que los linfocitos humanos de sangre periférica son una mezcla de linfocitos T y linfocitos B (122). Como sólo los

linfocitos T se estimulan por PHA soluble, se podría pensar que cualquier actividad enzimática que no esté presente en los linfocitos T va a ser proporcionalmente menor al fin de las 72 horas de la estimulación por PHA.

Con respecto a la segunda pregunta, esto es si la aparición del pico N_{II_s} se debe a síntesis neta de enzima o puede explicarse por un fenómeno de transporte, se puede calcular de la figura 3 qué porcentajes de la actividad de ADN polimerasa de citoplasma de linfocitos no estimulados le corresponden a las enzimas C_{I_n} y C_{II_n} .

Del mismo modo se puede calcular de la figura 6 el porcentaje de actividad de ADN polimerasa presente en N_{I_s} y N_{II_s} en núcleo de linfocitos estimulados. A partir de estos datos y teniendo en cuenta la actividad específica en núcleo y citoplasma de linfocitos sin estimular (Tabla I) y estimulados por PHA (Tabla II) se puede calcular la actividad específica de cada una de las enzimas encontradas en linfocitos estimulados y sin estimular.

Tabla V

Actividad específica de las ADN polimerasas de linfocitos sin estimular y estimulados por PHA

	% de Actividad	Actividad enzimática cpm/mgr proteína
N_{I_n}	100	588
C_{I_n}	62.6	210
C_{II_n}	37.4	125
N_{I_s}	22.4	403
N_{II_s}	77.6	1.277
C_{I_s}	100	1.907

Es evidente de los datos (Tabla V) obtenidos que en linfocitos estimulados la aparición del pico N_{II_s} debe involucrar síntesis neta de enzima, ya que aunque todo el pico C_{In} de propiedades similares pasara al núcleo no podría justificar el aumento de N_{II_s} . Por otra parte se observa que el aumento de actividad de ADN polimerasa en núcleo de linfocitos estimulados se debe a enzima N_{II_s} pues la enzima N_{I_s} se mantiene casi siempre sin variación respecto a la enzima nuclear de linfocitos sin estimular.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por varios investigadores en otros tejidos de eucariotes. Se observó que en células en activa replicación la actividad de la ADN pol β se mantiene constante y sólo aumenta la actividad de la ADN pol α (60-63-64-80).

Debe destacarse, sin embargo que la síntesis neta de enzima no excluye los fenómenos de interconversión enzimática. Ya Loeb trabajando con erizo de mar sugirió que el control de la replicación podría producirse por el pasaje de la polimerasa del citoplasma al núcleo.

Con respecto al posible rol fisiológico de las diferentes enzimas, se podría suponer que la enzima N_{II_s} es la responsable de la replicación. Esta enzima tiene propiedades semejantes a la ADN pol α encontrada en muchos tejidos de eucariotes (51) y es precisamente esta enzima la que está relacionada con la velocidad de crecimiento de las células. Estos resultados no concuerdan con otros obtenidos en nuestro laboratorio (154) en donde se vió que los núcleos aislados de linfocitos no estimulados (que no tienen la enzima N_{II}) podrían incorporar dNTP en forma tan eficiente como los núcleos aislados

de células estimuladas por PHA. Si bien es necesario realizar otros experimentos para entender la naturaleza de esta discrepancia, la explicación más simple es que la incorporación observada se debe a la enzima N_I . Pero hay que tener en cuenta de todos modos que al trabajar con núcleos aislados las condiciones no son fisiológicas y de ahí que los resultados obtenidos no puedan ser exactamente comparables con los obtenidos en célula entera.

Las enzimas N_{In} y N_{Is} se asemejan a la ADN polimerasa β de células eucariotes. Tanto la N_{In} como la N_{Is} incorporan (3H)TTP en el ADN en ausencia de los otros tres nucleótidos, una propiedad en común con la deoxinucleotidil transferasa (89-100) terminal, una enzima encontrada originariamente en timo de ternera. Pero el pH óptimo, la especificidad de sustrato y la inhibición por ATP de la transferasa terminal es distinta del de las enzimas N_{Is} y N_{In} . De los trabajos de Mc Caffrey, Smoler y Baltimore (102) se sabe que la transferasa terminal no se encuentra en cantidades detectables en linfocitos humanos de sangre normal, a diferencia de lo que ocurre con N_{Is} y N_{In} .

Existen varias posibilidades que explicarían el hecho de que si bien estas enzimas requieren los cuatro deoxinucleótidos trifosfatos para su máxima actividad muestran una importante incorporación con sólo 1, 2 ó 3 nucleótidos presentes.

- 1) La estructura del ADN activado contiene sitios 3'OH y esto permitiría a la enzima tener una actividad significativa, siempre y cuando se esté usando una cantidad grande de ADN con respecto a la enzima.

- 2) La enzima puede copiar preferentemente zonas homopoliméricas del ADN, y siempre que la relación ADN/enzima sea grande estas zonas estarían en exceso y la enzima podría incorporar solamente el dNTP apropiado.

Esta propiedad haría pensar que las enzimas N_{In} y N_{Is} tendrían como función reparar el ADN. Wicha y Stockdale (69) trabajando en células de músculo sugirieron para la ADN pol α una función replicativa y para la ADN pol β funciones de reparación del ADN. Esto mismo se desprende de los estudios de síntesis de ADN realizados in vitro en embriones de pollo usando distintos iniciadores. Craig, y Keir (71) trabajando con células BHK también le asignaron a la ADN pol α un rol replicativo y a la ADN pol β una función de reparación del ADN. Esta función adjudicada a la pol β no la descalifica sin embargo para integrar un complejo de replicación junto con la ADN pol α y otras enzimas.

Otro de los aspectos que se investigaron en el presente trabajo fue el de los pesos moleculares de las ADN polimerasas.

El peso molecular de las unidades activas de las polimerasas se obtuvo del análisis de los resultados de sedimentación y filtración por geles, adjudicándoles a la enzima C_{In} , C_{IIn} , C_{Is} y N_{IIs} , pesos moleculares de alrededor de 150.000. En el caso de estas enzimas se obtuvieron por sedimentación perfiles polidispersos entre los 300.000 daltons y 40.000 daltons.

Craig, Costello y Keir (73), mostraron que en células BHK la ADN polimerasa α es heterogénea, lo cual estaría de acuerdo con los resultados descriptos más arriba para la ADN pol α de linfo-

cidos.

Wang, Sedwick y Korn describieron en células KB una polimerasa con un PM de 175.000 compuesta de dos monómeros no activos de 87.000 daltons.

En timo de ternera y en tejido de rata existen formas enzimáticas con pesos moleculares entre 110.000 y 220.000 daltons que se componen según Holes de subunidades de 55.000 daltons.

Estos estudios juntos a los datos obtenidos nos permite especular que en linfocitos la enzima de alto PM está compuesta de subunidades de peso molecular aproximado de 50.000 daltons.

Para las enzimas N_{In} y N_{Is} de linfocitos se obtuvieron pesos moleculares de alrededor de 40.000 daltons. Estos datos son semejantes a los encontrados en la literatura para la ADN pol β .

Wang, Sedwick y Korn (55-70) describieron también en células KB una enzima de bajo PM. Esta enzima de 45.000 daltons es capaz de formar agregados a baja fuerza iónica con PM semejantes a la ADN pol α , pero que se distinguen de ésta en las propiedades enzimáticas que se mantienen semejantes a la del monómero. Otros investigadores encontraron en hígado de ratón y en núcleos de embriones de pollo que la ADN pol β tiene un PM de 27.000 - 29.000 daltons. Brun, Lauber y Chapeville (77) presentaron evidencias de que la ADN pol β de embriones de pollo está constituida por una sola cadena polipeptídica de 43.000 - 45.000 daltons, no encontrándose subunidades de menor PM. Estas diferencias no pueden ser aún resueltas.

La discrepancia entre los valores observados en gradientes y columnas de Sephadex puede provenir de la fuerza de centrifugación

que disocia a las unidades de las enzimas.

Aparte de las estimaciones de los pesos moleculares, otras propiedades enzimáticas de las ADN polimerasas C_{In} , C_{IIIn} , C_{Is} , N_{IIIs} y de las ADN pol N_{In} y N_{Is} son particularmente características de las especies 6-8s y 3-4s encontradas en células de eucariotes.

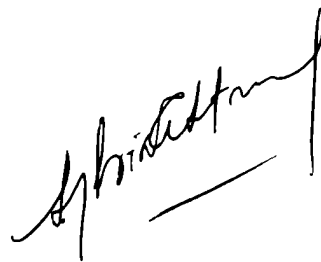
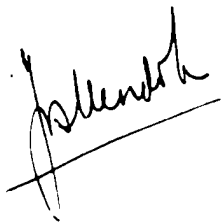
Las enzimas C_{In} , C_{IIIn} , C_{Is} , N_{IIIs} exhiben un ph óptimo cerca de la neutralidad (fig. 7) y son fuertemente inhibidas por agentes que se unen a grupos tioles (Tabla III), propiedades generalmente características de las polimerasas α . Por otro lado las enzimas N_{In} y N_{Is} tienen un ph óptimo alcalino (fig. 7) cuando se usa ADN activado y se muestran resistentes a la ausencia de los inhibidores de grupos tioles (Tabla III). Estas enzimas también se asemejan a las ADN pol α y ADN pol β respectivamente, por su especificidad de templado y requerimientos de precursores.

La relación entre las polimerasas de alto PM en citoplasma y núcleo fue analizada por varios investigadores (56-167-168). Basándose en que sus propiedades son muy similares se las consideró la misma enzima, aunque existen en la literatura algunas evidencias que sugieren que estas dos enzimas pueden ser distintas proteínas (70-169). De acuerdo con los resultados obtenidos de la cromatografía en DEAE (figuras 3, 5 y 6) estas enzimas eluyen a concentraciones salinas distintas, lo que lleva a pensar también que no son las mismas enzimas. Uno podría explicar la semejanza en sus propiedades físicas y enzimáticas suponiendo que estas enzimas comparten algunos péptidos que forman parte del sitio activo.

Spadari (170) y otros obtuvieron una relación antigénica entre estas enzimas cuando usaban antisuero de conejo contra la ADN pol α .

Es difícil todavía asignar un rol definitivo a las enzimas encontradas en linfocitos; aunque teniendo en cuenta las propiedades observadas para la enzima $N_{II\beta}$ y el hecho de que in vitro sólo la ADN pol α pueda iniciar la síntesis de ADN usando ARN como iniciador, sugiere que esta enzima tiene un posible rol en la replicación del ADN. De la misma forma los resultados obtenidos hasta ahora con la ADN pol β llevan a asignarles una función de reparación del ADN.

Mientras no se obtengan mutantes experimentales para la síntesis de ADN en células eucariotes podría lograrse un mayor entendimiento de los roles que cumplen estas enzimas en el complejo de replicación por el estudio de linfocitos de sangre leucémica donde el control de la replicación está alterado.



BIBLIOGRAFÍA

1. Watson, J., Crick, F. H. C., (1953), *Nature*, 177, 964.
2. Brutlag, D., Schekman, R., Kornberg, A., (1971), *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 68, 2826.
3. Wickner, W., Brutlag, D., Schekman, R., Kornberg, A., (1972), *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 69, 965.
4. Lark, K. G., (1972), *J. Mol. Biol.*, 64, 47.
5. Sugino, A., Hirose, S., Okazaki, R., (1972), *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 69, 88.
6. Sugino, A., Okazaki, R., (1973), *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 70, 88.
7. Miller, H. I., Riggs, A. D., Gordon, N. G., (1972), *J. Biol. Chem.*, 248, 2621.
8. Leis, J. P., Berkawer, I., Hurwitz, J., (1973), *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 70, 466.
9. Kornberg, A., (1969), 163, 1410.
10. Kornberg, T., Gefter, M., (1971), *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 68, 761.
11. Knippers, R., (1970), *Nature*, 228, 1050.
12. Kornberg, T., Gefter, M., (1972), *J. Biol. Chem.*, 247, 5369.
13. Gefter, M., Hirota, Y., Kornberg, T., Wechsler, J., Barnoux, C., (1971), *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 68, 3150.

14. Nusslein, V., Otto, B., Bonhoeffer, F., Schaller, H., (1971), Nature, 234, 285.
15. De Lucia, P., Cairns, J., (1969), Nature, 224, 1164.
16. Wickner, W., Scheckman, R., Geider, K., Kornberg, A., (1973), Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 70, 1764.
17. Huberman, J. A., Riggs, A. D., (1968), Chromosoma 41, 1.
18. Huberman, J. A., Riggs, A. D., (1968), J. Mol. Biol., 32, 327.
19. Callan, H. G., (1973), Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 38, 233.
20. Huberman, J. A., Horowitz, H., (1973), Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 38, 223.
21. Taylor, J. H., Wu, M., Erickson, L., (1973), Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 38, 225.
22. Schandle, E. K., Taylor, J. H., (1969), Biochem. Biophys. Res. Commun, 34, 291
23. Taylor, J. H., (1973), Proc. Natl. Acad. Sci, U.S.A., 70, 1083.
24. Chang, L. M. S., Bollum, F. J., (1972), Biochem. Biophys. Res. Commun, 46, 1354.
25. Keller, W., (1972), Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 69, 1560.
26. Pigiet, V., Eliasson, R., Reichard, P., (1974), J. Mol. Biol., 84, 197.
27. Du Praw, E. J., (1965), 53, 161.
28. Ris, H., (1966), 166, 247.
29. Mazia, D., (1974), Scientific American, 230, 54.
30. Mitchison, J. M., (1973), "The cell cycle in development and differentiation", Cambridge University Press, I.

31. Friedman, D., Mueller, G., (1969), *Biochem. Biophys. Acta*, 174, 253.
32. Loeb, L. A., Mazia, D., Ruby, A. D., (1967), *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 57, 841.
33. Fansler, B. F., (1974), *International Review of Cytology*, Supplement 4 (New York, Academic Press), 363.
34. Probst, G. S., Birkoff, E., Keller, S. J., Meyer, R., (1972), *Biochem. Biophys. Acta*, 281, 216.
35. Adams, R. L., Henderson, M. A., Wood, W., Lindsay, J., (1973), *Biochem. J*, 131, 237.
36. Burgoyne, L. A., Waqar, M. A., Atkinson, M. R., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 39, 254.
37. Burgoyne, L. A., Waqar, M. A., Atkinson, M. R., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 39, 918.
38. Slater, J. P., Loeb, L. A., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 41, 589.
39. Friedman, D. L., Mueller, G. C., (1968), *Biochem. Biophys. Acta*, 161, 455.
40. Kidwell, W. R., Mueller, G. C., (1969), *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 36, 756.
41. Schandle, E. K., Taylor, J. H., (1969), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 34, 291.
42. Waqar, M., Burgoyne, L., Atkinson, M., (1971), *Biochem. J*, 121, 803.
43. Thompson, L., Mc Carthy, B., (1968), *Biochem. Biophys. Research. Commun.*, 30, 166.

44. Thompson, L., Mc Carthy, B., (1971), Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol., 30, 1177.
45. Loeb, L., Agarwal, S., (1971), Exp. Cell Res., 66, 299.
46. Fansler, B., Loeb, L. A., (1969), Exp. Cell Res., 57, 305.
47. Fansler, B., Loeb, L. A., (1972), Exp. Cell Res. 75, 433.
48. Bollum, F. J., (1959), Cancer Res., 19, 561.
49. Temin, H., Mizutani, S., (1970), Nature, 226, 1211.
50. Gallo, R., Yang, S., Ting, R., (1970), Nature, 228, 927.
51. Weissbach, A., (1975), Cell, 5, 101.
52. Sedwick, W. D., Shu-Fong, Wang, T., Korn, D., (1975), J. Biol. Chem., 250, 7045.
53. Chang, L. M., Bollum, F. J., (1973), J. Biol. Chem., 248, 3398.
54. Chang, L. M., Bollum, F. J., (1972), Biochemistry, 11, 1264.
55. Shu-Fong Wang, T., Sedwick, D., Korn, D., (1975), 250, 7040.
56. Weissbach, A., Schlabach, A., Fridlender, B., Bolden, A., (1971), Nature New Biol., 231, 167.
57. Fridlender, B., Fry, M., Bolden, A., Weissbach, A., (1972), Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 69, 452.
58. Spadari, S., Weissbach, A., (1974), J. Biol. Chem., 249, 2991.
59. Fry, M., Weissbach, A., (1973), Biochem., 12, 3602.
60. Bellair, J., (1968), Biochem. Biophys. Acta, 161, 119.
61. Iwamura, Y., Ono, T., Morris, H., (1968), Cancer Res., 29, 1562.
62. Ove, P., Brown, O., Lazlo, J., (1969), Cancer Res. 29, 1562.
63. Ove, P., Jenkins, M., Lazlo, J., (1970), Cancer Res., 30, 535.
64. Baril, E., Brown, O., Jenkins, M., Lazlo, J., (1971), Biochemistry, 10, 1981.

65. Baril, E., Brown, O., Jenkins, M., Lazlo, J., (1971), *Biochemistry*, 10, 1981.
66. Chiu, J., Siung, S., (1970), *Biochem. Biophys. Acta*, 209, 34.
67. Chiu, J., Siung, S., (1971), *Biochem. Biophys. Acta*, 246, 44.
68. Adams, R., Henderson, M., Wood, W., Lindsay, J., (1973), *Biochem. J.*, 131, 237.
69. Wicha, M., Stockdale, F., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 48, 1079.
70. Sedwick, W., Wang, T., Korn, D., (1972), *J. Biol. Chem.*, 247, 5026.
71. Craig, R. K., Keir, H., (1975), 145, 215.
72. Craig, R. K., Keir, H., (1975), *Biochem. J.*, 145, 225.
73. Craig, R. K., Costello, P. A., Keir, H., (1975), *Biochem. J.*, 145, 233.
74. Lazarus, L., Kitron, N., (1973), *J. Mol. Biol.*, 81, 529.
75. Hecht, N., (1973), *Biochem. Biophys. Acta*, 312, 471.
76. Hecht, N., Davidson, D., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 51, 229.
77. Brun, G., Rougeon, F., Lauber, M., Chapeville, F., (1974), *Eur. J. Biochem.*, 41, 241.
78. Momparler, R., Rossi, M., Labitan, A., (1973), *J. Biol. Chem.*, 248, 285.
79. Chang, L., Bollum, M., (1972), *J. Biol. Chem.*, 247, 7948.
80. Chang, L., Brown, M., Bollum, F., (1973), *J. Mol. Biol.*, 74, 1.
81. Chiu, J., Sung, S., (1972), *Biochem. Biophys. Acta*, 269, 364.
82. Stockdale, F., (1971), *Science*, 171, 1145.
83. Stockdale, F., O'Neill, M., (1972), *J. Cell Biol.*, 52, 589.

84. Craig, R., Costello, P. A., Keir, H., (1975), *Biochem. J.*, 145, 233.
85. Lewtas, N. J., Abrell, J. W., Smith, H. G., Gallo, R. L., (1974), *Science*, 183, 867.
86. Bolden, A., Fry, M., Muller, R., Citarella, K., Weissbach, A., (1972), *Arch. Biochem. Biophys.*, 153, 26.
87. Yoshida, S., Ando, T., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 60, 1193.
88. Gibor, A., Gramick, S., (1964), *Science*, 145, 890.
89. Meyer, R. R., Simpson, M. V., (1968), *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 61, 130.
90. Meyer, R. R., Simpson, M. V., (1970), *J. Biol. Chem.*, 245, 3426.
91. Winterberger, V., Winterberger, E., (1970), *Eur. J. Biochem.*, 13, 20
92. Tibbetts, J. B., Vinograd, J., (1973), *J. Biol. Chem.*, 248, 3367.
93. Tibbetts, J. B., Vinograd, J., (1973), *J. Biol. Chem.*, 248, 3380.
94. Soriano, L., (1972), *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.*, 22, 310.
95. Westergaard, O., Linderberg, B., (1972), *Eur. J. Biochem.*, 28, 422.
96. Sarngadharan, M. G., Sarin, P. S., Reitz, M. S., Gallo, R. C., (1972), *Nature New Biol.*, 240, 67.
97. Gallo, R. C., (1971), *Nature (London)*, 234, 194.
98. Temin, H., Baltimore, D., (1972), *Adv. Virus Res.*, 17, 719.
99. Krakow, J. S., Coutsogeorgopoulos, C., Canellakis, E. S., (1962), *Biochem. Biophys. Acta*, 55, 639.
100. Yoneda, M., Bollum, F., (1965), *J. Biol. Chem.*, 240, 3385.
101. Wang, T. Y., (1968), *Arch. Biochem. Biophys.*, 127, 235.
102. Mc Caffrey, D., Smoler, D. F., Baltimore, D., (1973), *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 70, 521.

103. Waqar, M., Huberman, J., (1973), *Biochem. Biophys, Res. Commun.*, 51, 174.
104. Fox, R., Mendelson, J., Barbosa, E., Goulian, M., (1973), *Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol.*, 32, 529.
105. Keller, W., Crouch, R., (1972), *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 69, 3360.
106. Henry, C. M., Ferdinand, F. J., Knippers, R., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 50, 603.
107. Herrick, G., Alberts, B., (1973), *Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol.*, 32, 497.
108. Littlefield, J., Mc Govern, A., Margeson, k., (1963), *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 49, 102.
109. Gold, M., Helleiner, C. W., (1964), *Biochem. Biophys. Acta*, 80, 193.
110. Eckstein, H., Paduch, V., Hilz, H., (1967), *Eur. J. Biochem.*, 3, 224.
111. Howell, S., Hecht, N., (1971), *Biochem. Biophys. Acta*, 240, 343.
112. Rueckert, R. R., Mueller, G. C., (1960), *Cancer Res.*, 20, 1584.
113. Stubblefield, E., Murphree, S., (1967), *Exp. Cell Res.*, 48, 652.
114. Schonherr, O., Wanka, F., (1961), *Biochem. Biophys. Acta*, 232, 83.
115. Brewer, E., Rush, H., (1966), *Biochem. Biophys, Res. Commun.*, 25, 579.
116. Hecht, N., (1972), *Exp. Cell Res.*, 70, 248.
117. Friedman, D. L., Mueller, G. C., (1968), *Biochem. Biophys, Acta*, 161, 455.
118. Friedman, D. L., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 39, 100.

119. Loeb, L., (1974), "The Enzymes", 10, (New York: Academic Press), 173.
120. Cooper, H. L., (1960), J. Biol. Chem., 244, 5590.
121. Loeb, L., Agarwal, S. S., Woodside, A. M., (1968), Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 61, 827.
122. Greaves, M. F., Janossy, G., (1972), Transplant Rev., 11, 143.
123. Claman, H. N., Chaperon, E. A., Tripetti, R. F., (1966), Proc. Fed. Exp. Biol. Med., 122, 1167.
124. Raff, M. C., (1973), Nature, 242, 19.
125. Nowell, P. C., (1960), Cancer Res., 20, 462.
126. Sumner, J. B., (1919), 37, 137.
127. Farner, P., Barker, B. E., Brownhill, L. E., Fanger, H., (1964), Lancet, 11, 1100.
128. Peavy, D. C., Adler, W. H., Smith, R. T., (1970), J. Immunol., 105, 1453.
129. Seel, S., (1970), Transplant Rev., 5, 35.
130. Greaves, M. F., (1970), Transplant Rev., 5, 45.
131. Rigas, D. A., Johnson, E. A., (1964), Ann. N. Y. Acad. Sci., 113, 800.
132. Rigas, D. A., Head, C., (1969), Biochem. Biophys. Res. Commun., 34, 633.
133. Olson, M. O., Liener, I. E., (1967), Biochemistry, 6, 105.
134. Goldstein, I. J., Hollerman, C. E., Smith, S., (1965), Biochemistry, 4, 876.
135. Yariv, J., Kaeb, A. J., Levitzki, A., (1968), Biochem. Biophys. Acta, 165, 303.

136. Saito, M., Yoshizawa, T., Aoyagi, T., Nagai, Y., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 52, 569.
137. Novogrodsky, A., Katchalski, E., (1971), *F. E. B. S. Letters*, 12, 297.
138. Greaves, M., Bauminger, S., (1972), *Nature New Biol.*, 235, 67.
139. Anderson, J., Edelman, G. M., Möller, G., Sjöberg, O., (1972), *Eur. J. Immunol.*, 2, 233.
140. Betel, I., Van Der Berg, K. J., (1972), *Eur. J. Biochem.*, 30, 571.
141. Hirschorn, R., Brittinger, G., Hirschorn, K., Weissman, G., (1968), *J. Cell Biol.*, 37, 412.
142. Polgar, P. R., Kibrick, S., Foster, J. M., (1968), *Nature*, 218, 596.
143. Stein, G., Baserga, R., (1972), *Adv. Canc. Res.*, 15, 287.
144. Rubin, A. D., Davis, S., Schultz, E., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 46, 2067.
145. Pogo, B. G., Allfrey, V. G., Mirsky, A. E., (1966), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 55, 805.
146. Jackson, J. F., Killander, D., (1964), *Exptl. Cell. Res.*, 33, 459.
147. Steffen, J. A., Stolfzman, W. M., (1969), 56, 453.
148. Agarwal, S., Loeb, L., (1972), *Cancer Res.*, 32, 107.
149. Biza, D. C., Degani, O., Dausset, J., Davies, D. A., (1970), *Nature*, 226, 949.
150. Tyrtesd, G., Munch-Petersen, B., Cloos, L., (1973), *Cancer Res.*, 77, 415.
151. Lanotte, M., Panijel, J., (1973), *Nature New Biol.*, 245, 41.

152. Soulell, C., Panijel, J., (1970), *Nature*, 227, 456.
153. Gottlieb, A., Taylor, L., Sansheimer, P., (1970), *Biochem.*, 9, 4522.
154. Fridlender, B., Medrano, E., Mordoh, J., (1974), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 71, 1128.
155. Bobrow, S. N., Smith, R. G., Reitz, M. S., Gallo, R., (1972), *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 69, 3228.
156. Smith, R. G., Gallo, R., (1972), *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 69, 2879.
157. Lewis, B. J., Abrell, J. W., Smith, R. G., Gallo, R. (1974), *Biochem. Biophys. Acta*, 349, 148.
158. Schlabach, A., Fridlender, B., Bolden, A., Weissbach, A., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 44, 879.
159. Martin, R., Ames, B., (1961), 236, 1372.
160. Lowry, O. H., Rosebrugh, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J., (1951), *J. Biol. Chem.*, 193, 265.
161. Byrnes, J. J., Downey, K. M., So, A. G., (1973), *Biochemistry*, 12, 4378.
162. Byrnes, J. J., Downey, K. M., So, A. G., (1974), *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 71, 205.
163. Herrick, G., Spear, B., Veomett, G., (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 73, 1136.
164. Byrnes, J. J., Downey, K. M., Jurmark, B. S., So, A. G., (1974), *Nature*, 248, 687.
165. Lindsay, J. G., Berryman, S., Adams, R. L., (1970), *Biochem. J.* 119, 839.

166. Wang, T. S., Sedwick, W. D., Korn, D., (1975), J. Biol. Chem., 250, 7040.
167. Roufa, D. J., Moses, R. E., Reed, S. J., (1975), Arch. Biochem. Biophys., 167, 547.
168. Matukage, A., Bohn, E. W., Wilson, S. H., (1974), Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 71, 578.
169. Tsurno, T., Hirayama, K., Ukita, T., (1975), Biochem. Biophys. Acta, 383, 274.
170. Spadari, S., Muller, R., Weissbach, A., (1974), J. Biol. Chem., 249, 2991.