

11261
1e)
4

TESIS QUE PRESENTA EL MEDICO CIRUJANO

JUAN FERRER DARRIO VAREZ

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

CARRERA DE GENÉTICA MOLECULAR

DEPENDIENTE DE LA FACULTAD DE CIENCIAS, U.N.B.M.

FALLA DE ORIGEN

11261

1982



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I	INTRODUCCION	1
II	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	16
III	RESULTADOS	19
IV	DISCUSION	60
V	CONCLUSION	63
VI	BIBLIOGRAFIA	65

INTRODUCCION

ESTRUCTURA DE LA CELULA: La célula, como entidad aislada, se puede dividir en dos compartimentos, el nuclear y el citoplásmico (1). El compartimento citoplásmico está limitado por la membrana plasmática. El compartimento nuclear por la membrana nuclear. Dentro del citoplasma se encuentra un conjunto de organelos y estructuras que llevan a cabo funciones especializadas (1). Entre los organelos se hallan las mitocondrias, la membrana plasmática, el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi, los lisosomas y los peroxisomas (1). Entre las estructuras que no son organelos, se encuentran los microtúbulos, contruidos de tubulina (1,2); los microfilamentos que resultan de la interacción de miosina con actina (1,3) y los filamentos intermedios cuya composición y función, hasta el momento, no se conoce con precisión (1,4). El citosol es la porción no particulada del citoplasma (1).

El núcleo celular está limitado por una doble membrana que en conjunto se llama membrana nuclear (1, 5-7). La membrana exterior de esta doble membrana se continua con el retículo endoplásmico rugoso (5,7). En la porción exterior del núcleo se hallan adheridos ribosomas que pueden sintetizar proteínas y translocar éstas al espacio entre las dos membranas, nombrado espacio o cisterna perinuclear (5,7). En los lugares de fusión de las dos membranas, externa e interna, se forman organelos especializados llamados poros nucleares, cuya función es la de proveer una vía de intercambio entre el citoplasma y el nucleoplasma (1, 5-7). Dentro del núcleo se halla la cromatina (1, 5-8), complejo supramolecular formado por ácido desoxirribonucleico y proteínas (1,6,8); y el nucleolo (1). El nucleoplasma es la sustancia amorfa que llena el espacio entre la cromatina y el nucleolo (1). Es en el núcleo donde se llevan a cabo dos procesos fundamenta-

les: La transcripción y la duplicación del DNA, ambos dependientes de calcio y una maquinaria biosintética específica (9-11).

PAPEL DEL CALCIO EN LA FISIOLÓGIA CELUGAR: El calcio participa en una gran cantidad de procesos intracelulares tales como son la contracción muscular (12-13), la secreción de hormonas (12-15, 19), la activación de enzimas (12-15, 20), la liberación de neurotransmisores (12-15, 21, 22), la fosforilación de proteínas membranales (12-15, 23) y la síntesis de DNA (10) y RNA (11).

En términos generales, el calcio actúa como segundo mensajero o factor de acoplamiento (12). Para que el calcio lleve a cabo la función requerida, debe unirse a una proteína específica (16). Esta puede ser la troponina, en el caso de la contracción del músculo esquelético (17, 18), o la calmodulina, en el caso de la secreción de neurotransmisores (13-15), activación de enzimas (13-15), fosforilación de proteínas intrínsecas de membrana (23) y secreción de hormonas (15-15).

La calmodulina (EM-16 700) es una proteína monomérica que se caracteriza por tener una gran cantidad de residuos de ácido glutámico y aspártico, carecer de cisteína y triptófano y la presencia de trimetil-lisina (13-15, 24). Su secuencia de aminoácidos puede ser dividida en 4 dominios homólogos, cada uno de los cuales puede fijar un ión calcio (13, 15, 24), con una afinidad de 10^6 M^{-1} (13). La unión de éstos iones a la proteína induce cambios conformacionales profundos (13, 25). La actividad biológica de la calmodulina es inhibida por ciertas drogas antipsicóticas del tipo de las fenotiazinas, tales como la trifluoperacina, que se fija a la proteína con una constante de afinidad de 10^5 M^{-1} (13, 26). A través de la calmodulina el calcio puede activar en forma directa un proceso, interactuando con la enzima específica, o en forma indirecta, activando a proteínas

quinasas dependientes de calcio (15). De aquí la gran versatilidad de este catión.

REGULACION DEL CALCIO INTRACELULAR: Puesto que el calcio lleva a cabo papeles de segundo mensajero, su concentración debiera ser finamente regulada por organelos tales como las mitocondrias, retículo endoplásmico y membrana plasmática.

a). **LA MITOCONDRIA:** Las mitocondrias poseen dos membranas, una interna y la otra externa. La membrana interna se pliega formando las crestas mitocondriales. El espacio entre las dos membranas se llama espacio intermembranal y la matriz corresponde a la sustancia amorfa que se encuentra entre cresta y cresta, en el interior de la mitocondria (1,9). La membrana mitocondrial externa es permeable a moléculas más o menos grandes, tales como el ATP (9,27). En la membrana mitocondrial interna se hallan las enzimas de la cadena respiratoria, el complejo de la ATP sintasa dependiente del gradiente electroquímico y un conjunto de transportadores que van a permitir el flujo de metabolitos, cationes y aniones del interior de la mitocondria al citoplasma y viceversa (9). Es en la matriz mitocondrial donde se hallan la mayoría de las enzimas del ciclo de Krebs, parte de las enzimas del ciclo de la urea, el conjunto enzimático de la beta-oxidación (9), la enzima que cataliza la transformación de colesterol a pregnenolona, pose limitante en la biosíntesis de las hormonas esteroideas (26) y aquella otra que forma el 1,35 diOH Vit D₃ a partir del 25 OH Vit D₃ (28).

El papel de las mitocondrias es múltiple y complejo. Es en éstos organelos donde se lleva a cabo la degradación final de los aminoácidos, carbohidratos y lípidos, acoplándose a ésta oxidación la síntesis de ATP (9,30). En el transporte de los electrones a través de la cadena respiratoria se bombean en forma vectorial protones al exterior de la mitocondria, creándose un gradiente electro-

químico que se utiliza para la síntesis de ATP (9,30) y el transporte de calcio al interior de la mitocondria (30-35, 35a). Por otra parte, la mitocondria posee un camino separado para la salida del calcio (32,36-45). Así pues, se crea un ciclo de calcio y la posibilidad de regular la concentración de este catión por la mitocondria (41,42). El transportador para la entrada de calcio trabaja, en mitocondria de músculo cardíaco, con una constante de afinidad para el calcio, en ausencia de magnesio, de 1-5 μ M; en presencia de 1mM de magnesio, la cinética de transporte se hace sigmoidica y la constante de Michaelis sube a 30 μ M (41). En mitocondria de músculo cardíaco el calcio sale por un transportador que intercambia dos Na^+ por un Ca^{++} electroneutralmente (41). En mitocondria de hígado de rata, al parecer, el transportador intercambia protones por calcio electroneutralmente (37) y ésta salida es regulada por la relación NADH/NAD (36) o NADPH/NADP (43).

En condiciones intracelulares, la mitocondria opera en un ambiente cuya concentración de calcio en el citosol es menor de 1 μ M (41,45) y de 1-10 μ M en la matriz mitocondrial (41). La concentración de magnesio es de 1-2mM fuera y la de sodio 5mM (41). Bajo estas condiciones, el transporte de calcio por la mitocondria de músculo cardíaco y su eflujo operarán aproximadamente a la misma velocidad (41).

b). EL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO: Como de los organelos que posiblemente participe en la regulación del calcio citosólico es el retículo endoplásmico. Este es un conjunto de túbulos situados en el citoplasma, cuyas paredes están formadas de membrana (1). El retículo endoplásmico posee una ATPasa dependiente de calcio, con una K_m de 1-1 μ M (46). El transporte de calcio por los microsomas puede ser incrementado incubando a los hepatocitos con glucagon y ATPe (47-49). Al parecer, el glucagon se une a un receptor específico en la membrana plasmática del

hepatocito (50,51), activa a la adenilato ciclasa (50,51), produce AMPc (50) y activa a las proteínas kinasas dependientes de AMPc (52), las cuales fosforilan a una proteína del retículo endoplásmico semejante a la fosfolamban (53), incrementándose, de ésta manera, el transporte de calcio al interior del retículo endoplásmico (47-49).

En músculo esquelético, quien lleva a cabo la función de regular la concentración de calcio es el retículo sarcoplásmico (47,54-56). Este organelo posee una ATPasa dependiente de calcio (56,57), que genera un gradiente al bombear el calcio a través de la membrana. El transporte de calcio por los microsomas puede ser incrementado incubándose al músculo esquelético con AMPc (53). La activación se debe a la fosforilación de la proteína fosfolamban (53).

Por otra parte, existe un mecanismo diferente para el flujo de calcio en retículo sarcoplásmico (58), con lo que se forma el ciclo entrada-salida.

c). LA MEMBRANA PLASMÁTICA: Finalmente, todo el calcio que entra a la célula desde el espacio extracelular deberá ser expulsado, puesto que en condiciones fisiológicas no se observa la acumulación progresiva de éste catión en mitocondria o en retículo endoplásmico (32). Le corresponde a la membrana plasmática el papel de sacar el calcio que entra a la célula (52). Por lo pronto, se han demostrado transportadores de calcio en la membrana plasmática del eritrocito de mamífero (59-61), músculo esquelético (62,63), y músculo cardíaco (64). La actividad de algunos de éstos, como la ATPasa dependiente de calcio del eritrocito de mamífero, a su vez, es regulada por la concentración de calcio intracelular, mediada por el complejo calcio-calmodulina (59-61). Así pues, la membrana plasmática posee mecanismos de bombeo específicos, dependientes de energía, sea esta el ATP (62) o un gradiente electroquímico (64). Por otra parte, la entrada de calcio a la célula se lleva a cabo por canales diferentes a los mencionados atrás

(12). Algunos de éstos dependen del potencial de membrana (12,65), mientras que otras vías de entrada son independientes de dicho potencial (12,65).

d). CONCLUSION: En resumen, se puede decir que la concentración de calcio en el citosol es finamente regulada por tres organelos: mitocondrias, retículo endoplásmico y membrana plasmática. Cada uno de estos organelos posee una vía específica para la salida de calcio y otra vía específica para la entrada (41, 54,59,62,65). Se forma el ciclo del calcio y la posibilidad de regular la concentración de calcio en el citosol a través de la regulación de la actividad de éstas dos vías independientes de transporte de calcio (41,56). El papel de cada uno de éstos organelos en la regulación del calcio en un tipo celular determinado, dependerá de su predominio en dicha célula específica (52).

CICLO CELULAR. PAPEL DEL CALCIO EN LA DIVISION CELULAR: Clásicamente se divide al ciclo celular en cuatro fases: G₁, S (síntesis de DNA), G₂ y M (mitosis) (66,67). G₁ es el período entre M y la iniciación de la síntesis de DNA; G₂ es el período entre S y M. Para aquellas células que existen en un estado de reposo durante el cual no se duplican por largos períodos de tiempo, se ha postulado un quinto estado llamado G₀ (66,67).

a) FASE G₁ Y G₀: Cuando una célula llega a la fase G₁, se encuentra ante dos posibilidades: o salirse del ciclo replicativo a la fase G₀ o iniciar la síntesis de DNA y avanzar hacia las demás fases del ciclo, hasta finalizar con la división celular (67). Algunas de las condiciones que desvían a la célula hacia la fase G₀ incluyen la alta densidad celular, la privación de suero, la limitación de algunos aminoácidos, sulfato, glucosa, lípidos o biotina y la presencia de ciertas drogas como la cafeína, que aumenta la concentración del AMPc al inhibir a la fosfodiesterasa, y los glucocorticoides, cuyo mecanismo de acción

no se conoce (67). Entre los factores que influyen para que una célula cruce el punto de restricción (67) e inicie la síntesis de DNA, se encuentran los factores proteícos de crecimiento (67-74) y los cationes divalentes, especialmente el calcio. Withfield, J. F., et. al. demostraron que aumentando la concentración de calcio a 1.5mM, se disparaba la síntesis de DNA en los linfocitos del timo (10). La concavalina A requiere de la presencia de calcio para inducir la síntesis de DNA (10). Al parecer, la interacción de la concavalina A con el receptor aumenta la permeabilidad de la membrana plasmática al calcio (75) y activa a la adenilato ciclasa (10). De alguna manera, el calcio interviene luego en el inicio de la síntesis de DNA. La concavalina A incrementa, además, la concentración de GMPc en el citosol de los linfocitos del timo, proceso que requiere la presencia de calcio en el medio (10). La transformación de linfocitos por antígenos y mitógenos no específicos (lectinas) depende de la presencia de calcio (76). La fitohemaglutinina induce una lenta acumulación de calcio-45 por los linfocitos y la estimulación de la síntesis de DNA es inhibida por el EGTA (76). En presencia de calcio, la adición del ionóforo A23187 dispara la transformación de los linfocitos y la síntesis de DNA (76). En una investigación realizada en cultivo de células Swiss 3T3 por Barluigi, R. y Wiley, P. A. se demostró la presencia de un período crítico justo antes del inicio de la síntesis de DNA, durante el cual una depleción transitoria de calcio bloquea la entrada de la célula a la fase S del ciclo mitótico (77). Las células 3T3 de ratones en fase G1 cultivadas en un medio con baja concentración de calcio y un exceso de suero, pueden ser estimuladas a entrar a la fase S añadiéndoles calcio (78). Células 3T3 transformadas por el virus SV40 parecen no tener un punto de restricción sensible al calcio (78,79). La falta de dependencia al calcio puede ser un indicador de la transformación tumoral de la célula (80).

El mecanismo de acción por medio del cual el calcio induce la entrada de la célula a la fase S e inicia la síntesis de DNA no se conoce. Posiblemente participe la calmodulina, las proteínas kinasas dependientes de calcio, AMFc y una endonucleasa activada por calcio y magnesio. Los datos que fundamentan la proposición ésta, son los siguientes: 1.- Harper et. al., utilizando técnicas de inmunofluorescencia, demostraron la presencia de calmodulina en núcleos de células de corteza suprarrenal (81). La concentración de calmodulina en el núcleo varió con la estimulación hormonal de las células por la ACTH (81). 2.- Sikorska y colaboradores probaron la existencia de proteínas kinasas dependientes de calcio, AMFc y GMFc en los núcleos de las células que constituyen al hígado de rata (82). En un estudio posterior, este mismo grupo reportó la dependencia de la síntesis de DNA con respecto al calcio y a la calmodulina (83). 3.- Se ha encontrado una endonucleasa dependiente de calcio y magnesio en núcleos de hígado de rata (84-86), inhibida por la presencia de Mg^{2+} (85) en un proceso de ribosilación por adenosín difosfato (87) y activada por un factor proteico no purificado ni caracterizado (88).

b) FASE S: En los organismos eucariotes, el genoma está distribuido en varios cromosomas (8,87). Cada fibra de DNA se divide en muchas unidades de replicación, llamadas replicones; cada replicón tiene un origen desde el cual se inicia la síntesis de DNA en un sitio específico, en ambas direcciones (67,89-91). Junto con la duplicación del DNA existe la duplicación de las histonas (67,89,90). La síntesis de DNA puede dividirse en tres etapas: iniciación de la síntesis de DNA en un sitio del replicón, elongación de la cadena y terminación (67,89,90).

No se conoce el evento específico que inicia la síntesis de DNA en el replicón. Un posible evento temprano pudiera ser la ruptura del enlace fosfodiéster de una de las hebras del DNA, proporcionando extremos libres para la RNA polimerasa

o la DNA polimerasa (67). Con respecto a ésto, se ha comprobado la presencia de endonucleasas que atacan hebras dobles y sencillas de DNA (67). Algunas de éstas dependen del calcio para su actividad (84-86).

Una vez iniciada la síntesis del DNA se procede a su polimerización en ambas direcciones. Se construyen iniciadores de RNA por una RNA polimerasa (89-91), sobre los cuales se sintetizan los fragmentos de Okazaki por una DNA polimerasa alfa, en dirección 5' a 3' (89-92). Los fragmentos de RNA son hidrolizados por una RNasa H (89-91,93). Se llenan los espacios entre los fragmentos de Okazaki (89,90) y se unen por medio de una DNA ligasa I (89,90). Otras proteínas que participan en la síntesis de DNA son: las proteínas desestabilizadoras de la doble helice, las "swivelasas" del DNA, las proteínas descontroladoras del DNA y las girasas del DNA (67,89,90,94,95).

La terminación de la síntesis del DNA tiene como causa la duplicación del DNA hasta su final y la separación de las dos hebras con la ayuda de alguna enzima semejante a la girasa del DNA (95).

Asociada a la síntesis de DNA se encuentra la síntesis de las histonas (67, 89,90,97). Al parecer, las histonas se reparten aleatoriamente en las dos hebras del DNA (67,89). Una posible participación del calcio en este punto del ciclo celular sería la fosforilación de las histonas. Durante la fase S y la mitosis las histonas son fosforiladas por proteínas kinasas dependientes e independientes de ATPo (67,97). En cada caso, diferentes y altamente específicas serinas y treoninas son fosforiladas (67,97). H1 es fosforilada justo antes de entrar a mitosis (97,98), cuando la cromatina se condensa (97). En células de mamífero la fosforilación de H3 y H1 varía con respecto a la fase del ciclo celular (97,98). Se ha sugerido que diferentes niveles de organización de la cromatina se asocian con diferentes tipos de fosforilación: la fosforilación de

H1 probablemente se correlacione con un cambio en la organización a nivel molecular, la de H2a con la condensación de la heterocromatina y la de H1_M y H3 con la condensación de los cromosomas (97). De tal manera que, la fosforilación de H1_M y H3 prepara a los cromosomas para la entrada en la mitosis. No es nada improbable y sí muy sugestivo el postular un posible papel del calcio en este proceso de condensación de estas histonas. Masia y colaboradoras han reportado la presencia de una AEFasa dependiente de calcio durante la mitosis y le proponen un papel regulador de la concentración de calcio en la zona del núcleo (99).

c) FASE G₂ Y MITOSIS: Las células entran a la fase G₂ después de completar el período S. En G₂ se prepara la célula para entrar a mitosis (67). Existe evidencia de un punto de control en G₂, puesto que varias condiciones llevan a la célula a G₂ (67). Ya decidida la entrada a mitosis por la célula, existe una reorganización de los filamentos de actina (67,100) y tubulina (2,67,100). La tubulina, uno de los componentes del aparato mitótico, se sintetiza durante la fase S y G₂ (67), y es fosforilada en la fase M y S (67). Los eventos que inician la mitosis no se conocen. En profase se lleva a cabo la condensación de los cromosomas (1), necesaria para facilitar su movimiento y equipartición posteriores (8). La fosforilación de H1_M y H3 se asocia con la condensación de los cromosomas (97). Durante la anafase se separan los cromosomas (1). En este proceso participan los microtúbulos (1,100), los microfilamentos (1,100) y, al parecer, el calcio (100). Estudios de inmunofluorescencia llevados a cabo por Walsh y col. revelaron la presencia de calmodulina asociada a la región entre cromosoma y polo del aparato mitótico durante la metafase-anafase (100). La distribución de la calmodulina difiere completamente de la de tubulina (100). Concluyen que la calmodulina probablemente tenga un papel en el control del ciclo ensamblaje-desensamblaje de los microtúbulos durante la mitosis (100,101) y la nuclea-

ren un papel en el movimiento de los cromosomas (101). Mazia y colaboradores demostraron la presencia de una ATPasa dependiente de calcio asociada al aparato mitótico (99). La actividad de esta enzima crece mucho durante la mitosis en ciertos tipos celulares (103). La división de la célula (citokinesis) sigue a la mitosis (1,67). La citokinesis es inhibida por la citocalasina F, dando células binucleadas (67). La participación de los microfilamentos en la citokinesis se deduce de la inhibición de este proceso por la citocalasina F. Es lógico pensar que la citokinesis sea dependiente del calcio (1,2,100,101).

d) CONCLUSION: Así pues, el calcio tiene múltiples sitios de participación en el ciclo celular, algunos de los cuales han sido comprobados experimentalmente, y otros, escritos aquí como potencialidades lógicas. En resumen, el calcio participa en la decisión de entrada a la fase S durante la fase G₁, en la iniciación de la síntesis de DNA, en la fosforilación de histonas y no histonas durante la mitosis y la interfase; probablemente ayude a la condensación de los cromosomas, tenga un papel en el movimiento de los cromosomas durante la anafase y participe en la citokinesis o separación de las células.

PAPEL DEL CALCIO EN LA SÍNTESIS DE RNA: Otro proceso que se lleva a cabo en el interior del núcleo es la síntesis de RNA (1,9). Se puede dividir a éste proceso en tres etapas: la iniciación; la elongación, durante la cual la enzima RNA polimerasa sintetiza una hebra de RNA complementaria al DNA; y la terminación, en la cual una secuencia específica de nucleótidos en el DNA, junto con factores proteicos (factor rho), pone fin al proceso de la transcripción (9,104).

Para que se inicie la síntesis de RNA se requiere que la RNA polimerasa se una a un sitio específico del DNA (9,104). Esta unión depende de la desrepresión de una secuencia de nucleótidos en el DNA. Existen señales de inicio en la síntesis de RNA que descubren de alguna manera, éstas secuencias específicas

de nucleótidos en el genoma (11,105-109). Varios son los mecanismos por medio de los cuales trabajan éstas señales. Uno de ellos es el utilizado por las hormonas esteroideas (105-108). Estas cruzan la membrana plasmática debido a su carácter hidrofóbico, se unen a un receptor específico localizado en el citoplasma de la célula, se translocan al núcleo en forma de un complejo hormona-receptor, se unen a un sitio específico de la cromatina y, por medio de algún mecanismo todavía no resuelto, deprimen un conjunto de genes, disparando la síntesis de uno o varios RNAm (9,105-108). Entre las hormonas que trabajan con este mecanismo tenemos al cortisol, aldosterona, estradiol, testosterona, 1,25 diOH Vit D₃, etc (9).

Un segundo mecanismo es aquel en el cual el receptor para la hormona se encuentra directamente pegado a la cromatina (105). Este es el caso de la hormona tiroidea (105). Igualmente, con la unión de la hormona al receptor se suprime el genoma y se inicia la síntesis de un RNAm.

En un tercer mecanismo, las hormonas interactúan con un receptor a nivel de membrana plasmática, generan AMPc y activan a las proteínas quinasas correspondientes (9). La subunidad catalítica se transloca posteriormente al núcleo y fosforila proteínas no histonas e histonas (102,103-112). La fosforilación de estas proteínas, por un mecanismo que todavía no se conoce, da lugar a la deactivación del genoma y al disparo en la síntesis de RNAm (102,110,112). Esta es el caso específico de la inducción de tirosina hidroxilasa por el AMPc (109). La inducción de la hidroxilasa de tirosina se inhibe por agentes disruptores de los microtúbulos (109).

Finalmente, un cuarto mecanismo disparador y regulador de la síntesis de RNA sería a través del calcio. Se ha reportado la estimulación de la síntesis de RNA por calcio en tejido ventricular de mamífero (11), células CH₂ (130) y

cultivo de músculo pectoral de pollo (131). Kamungo y colaboradores han demostrado la fosforilación de proteínas no histonas y su modulación por el calcio (113). En este trabajo, el calcio estimula la fosforilación de las proteínas no histonas (113). Kamungo postula que el calcio, a través de la fosforilación de las proteínas cromosomiales, altera la transcripción y, por tanto, la actividad del genoma (113). Y Harper y colaboradores, sobre la presencia comprobada de calmodulina en núcleo, proponen un papel regulador del calcio sobre la síntesis de RNA (91).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Puesto que el calcio interviene en procesos específicamente nucleares, tales como la síntesis de DNA (10) y RNA (11,130,131), existe la posibilidad de que el núcleo regule su propia concentración de calcio a través de un transportador dependiente de energía, sea esta el ATP o un gradiente electroquímico. En este caso, la hipótesis alterna postula que la concentración de calcio en el núcleo depende de la concentración de calcio en el citoplasma, lo cual implica que el núcleo es permeable a este catión. Se escogió como hipótesis nula la primera proposición debido a lo siguiente: se ha reportado la presencia de cadena respiratoria en la membrana nuclear (5-7,114,115) y la formación de gradientes a través de ésta misma membrana (116,117). Al parecer, el núcleo posee una ATPasa semejante a la de la mitocondria (5,118). Con esta información, es válido deducir, en primer lugar, el enunciado de que la membrana nuclear posiblemente sea impermeable a partículas pequeñas tales como los hidrogeniones, los iones de sodio y los de potasio; y, en segundo lugar, de que el núcleo utilice ese gradiente para la síntesis de ATP, como propone Lehninger (9), el transporte de ácido ribonucleico (119) o la regulación del calcio intranuclear. Una primera aproximación al problema de la existencia del transportador de calcio, sería la comprobación de sitios de alta afinidad en el núcleo, por medio de un estudio de fijación de calcio (120).

Por otra parte, como se mencionó anteriormente, se ha reportado que el calcio estimula la síntesis de RNA en rebanadas de tejido ventricular (11), células CH₂ (130) y cultivo de músculo pectoral de pollo (131). Pero con respecto al mecanismo de acción solo existen evidencias indirectas. La presencia de proteínas quinasas dependientes de calcio en núcleos de hígado de rata (82), la modulación de la fosforilación de proteínas no histonas por calcio (115) y la presencia de calmodulina en el núcleo de algunas células (81), sugiere que el calcio puede estimular

la síntesis de RNA a través de su interacción con la calmodulina, activación de las proteín kinasas dependientes de calcio por éste complejo calcio-calmodulina, fosforilación de proteínas no histonas específicas y, finalmente, desrepresión del genoma. Con el objetivo de probar esta hipótesis, se investigó el efecto del calcio, la calmodulina y el inhibidor de la calmodulina: la clorpromazina, sobre la síntesis de RNA en núcleos aislados de hígado de rata.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

MATERIAL: De New England Nuclear se obtuvieron el calcio-45, la glucosa (14-C), el dextrán (14-C), el agua tritiada y el UTP (2,6-³H). De Sigma, la albúmina de huevo, la antimicina, la rotenona, la murexida, el ATP, GTP, UTP y CTP, la calmodulina y la clopromacina. De Baker, la sacarosa, el etilenglicol, el etanol absoluto, el xileno y el cloruro de potasio. Se utilizaron para los experimentos, ratas albinas Wistar, machos de 170 a 200 g.

AISLAMIENTO DE NÚCLEOS: Para aislar los núcleos de las células que constituyen el hígado de rata, se usó el procedimiento básico de Widnell y Tata (121), con algunas modificaciones. Se sacrificó la rata por decapitación y se le extrajo el hígado que inmediatamente se colocó en un medio de sacarosa 0.32 M, 5 mM de $MgCl_2$ a 0-4 C. El hígado fue lavado y finamente cortado con tijeras. Se enjuagó por 4 veces y se homogeneizó en tres volúmenes de la misma solución, con 10 a 20 pasadas, a 1200 rpm, utilizando un homogenizador de teflón. Se filtró el homogenizado a través de varias telas de nylon y se diluyó con 0.6 volúmenes de sacarosa 0.32 M/5 mM $MgCl_2$ y 0.4 volúmenes de agua destilada. El homogenizado diluido se colocó sobre 0.8 volúmenes de sacarosa 0.32 M/5 mM $MgCl_2$ y se centrifugó a 700g, durante 10 minutos, a 0-4 C. El paquete se resuspendió con 7-12 ml de sacarosa 2.4 M/1 mM $MgCl_2$ y se centrifugó a 50 000g, 60 minutos, 0-4 C. El precipitado de núcleos se resuspendió con sacarosa 0.25 M/1 mM $MgCl_2$ /2 mM triis-nupes pH 7.4.

MICROSCOPIA ÓPTICA Y ELECTRONICA: Se fijaron los núcleos con glutaraldehído al 3%, a 4 C, durante 3 horas. Se lavaron con un amortiguador de fosfato de sodio 0.1 M, pH 7.4, sacarosa 0.25 M y se dejaron en este medio de lavado por 24 horas, a 4 C. Se post-fijaron con tetróxido de osmio al 2%, durante 2 horas. Se deshidrataron con concentraciones crecientes de alcohol y óxido de propileno.

Se incluyeron en Epón 812. Se hicieron cortes gruesos para microscopía óptica y cortes finos para microscopía electrónica.

DETERMINACION DE VOLÚMENES NUCLEARES: Para medir la distribución de los solutos en los volúmenes nucleares, se utilizó el procedimiento de Hunter y Brierley (122), con algunas modificaciones. Se incubaron los núcleos (alícuotas de 200 ul) por 5 minutos en presencia de los solutos marcados, a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación, los núcleos se recuperaron por centrifugación en microfuga (5 minutos). Los sobrenadantes se decantaron y los tubos de microfuga se secaron cuidadosamente con papel absorbente fino. Los precipitados se extrajeron con 50 ul de $HClO_4$ 1 M, se diluyeron con 50 ul de agua destilada y la proteína desnaturalizada se removió por centrifugación en microfuga. La radiactividad del extracto se determinó tomando alícuotas de 100 ul y vaciándolas a un vial con 10 ml de líquido de centelleo. La radiactividad de los primeros sobrenadantes se midió en forma semejante.

FIJACION DE CALCIO: Para medir la fijación de calcio a núcleos se utilizó el procedimiento de Reynafarje y Lehninger (120) y el de Reed y Tygrave (125), con algunas modificaciones. Se incubaron 12 mg de proteína nuclear en un volumen de 6 ml, por 2 minutos, en un medio de sacarosa 0.25 M y otras sustancias (rotenona, antimicina, $MgCl_2$, tris-hepes), dependiendo del experimento. Al finalizar los 2 minutos, se transfirieron alícuotas de 500 ul a tubos de microfuga conteniendo calcio-45 (14 000 cpm) y concentraciones crecientes de calcio frío, incubándose por otros 10 minutos. Se tomaron muestras de 100 ul para contar radiactividad total. Terminado el tiempo de incubación, se removieron los núcleos del medio por centrifugación en microfuga, durante 2 minutos, y se tomaron alícuotas de 100 ul del sobrenadante para contar la radiactividad.

TRANSPORTE DE CALCIO: El estudio de transporte de calcio por núcleos se

midió por espectroscopía (124), utilizando a la murexida como indicador. Las longitudes de onda con las que se trabajó fueron: 540 y 507 nm. Los decrementos en la absorbancia se calibraron por la adición de concentraciones conocidas de calcio al medio.

DETERMINACION DE LA SINTESIS DE RNA: La síntesis de RNA se llevó a cabo siguiendo el método reportado por Schiaffonati y colaboradores (131). El ensayo se inició con la adición de los núcleos a la mezcla de reacción. La mezcla final contenía 55-55 μ g de proteína nuclear, 12.5% glicerol, 150 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 25 mM tris-HCl pH 8, 2.5 mM mercaptoetanol, 0.4 mM ATP, GMP, GTP y 0.05 mM UTP(3H) (0.65 Ci/mmol) en un volumen de 0.1 ml. La mezcla fue incubada por 10 minutos a 37 C. La reacción se paró por la adición de 5 ml de ácido tricloracético al 10%/40 mM pirofosfato de sodio. El material precipitado se coleccionó por filtración a través de papeles filtro Whatman GF/A, y se lavó con 50 ml de la misma solución y 5 ml de etanol. La radiactividad se determinó en un espectrofotómetro de líquido de centelleo.

MÉTODOS ANALÍTICOS: La concentración de proteínas se determinó por el método de biuret (125), usando albúmina de huevo como patrón. La concentración de DNA y RNA por el método de Schneider (126). La citocromo oxidasa se determinó por el método de Cooperstein (127) y la glucosa 6 fosfatasa según Nordlie (128).

RESULTADOS

AISLAMIENTO DE NÚCLEOS: Con el fin de conocer la integridad de los núcleos y el grado de contaminación por retículo endoplásmico y mitocondria, se ensayaron criterios químicos, enzimáticos y de microscopía óptica y electrónica. La tabla I muestra los resultados obtenidos. Las relaciones de RNA/DNA y de proteínas/DNA fueron de 0.19 ± 0.02 y 3.77 ± 0.21 respectivamente. La actividad de la citocromo oxidasa dió un valor de 19.5 ± 3.1 nanomoles de ferrocianuro oxidado min^{-1} mg de proteína $^{-1}$ y la de la glucosa 6 fosfatasa de 22.8 ± 0.72 nanomoles de fosfato inorgánico liberados min^{-1} mg de proteína $^{-1}$. No hubo diferencia significativa entre éstos valores y los de la columna adyacente en la tabla I, datos que fueron obtenidos de la literatura.

Al microscopio de luz, se observó un 20% de núcleos rotos (Fig 1). No se observó contaminación con glóbulos rojos.

Con la microscopía electrónica se detalló la estructura nuclear (Fig 2 y 3). Como puede verse, los núcleos poseen uno o varios nucleolos, una doble membrana, un espacio entre estas dos membranas o cisterna perinuclear, los poros nucleares, el nucleoplasma y la cromatina (Fig 3). El espacio entre las dos membranas se encuentra agrandado (Fig 2). En otros núcleos, se observa el desprendimiento de la membrana interna (Fig 2). No se encontró contaminación por mitocondrias y la contaminación con retículo endoplásmico fue mínima (Fig 2). Por otra parte, pueden observarse algunos núcleos rotos (Fig 2).

Por tanto, nuestras preparaciones nucleares se encontraban suficientemente puras y podía trabajarse con ellas para los siguientes experimentos.

DISTRIBUCION DE LOS BOMBITOS MARCADOS EN LOS ESPACIOS NUCLEARES: Con el objetivo de cuantificar los volúmenes nucleares, se incubaron los núcleos con los solutos marcados, por 5 minutos. Se centrifugaron en microfuga y se toma-

TABLA 1. Parámetros químicos y enzimáticos de los núcleos aislados por el método de Widnell, C.C. y Tata, J.P. (115).

La concentración de RNA y DNA se determinó con la técnica de Schneider (126). Proteínas por el método de Biuret (125). Citocromo oxidasa en base a la metodología de Cooperstein (127) y la glucosa 6 fosfatasa según Nordlie (128). La actividad de la citocromo oxidasa se expresa en nanomoles de ferrocianuro oxidado min^{-1} mg de proteína $^{-1}$. La actividad de la glucosa 6 fosfatasa se da en nanomoles de fosfato inorgánico liberados min^{-1} mg de proteína $^{-1}$. Los resultados representan la media de 3 experimentos \pm desviación estándar.

TABLA I

RNA/DNA	0.19 ± 0.02	0.20 ± 0.02^1
PROTEINA/DNA	3.77 ± 0.21	3.74 ± 0.21^1
CITOCROMO OXIDASA	19.50 ± 3.1	11.7^1
GLUCOSA 6 FOSFATASA	22.80 ± 0.72	22.5^2

1 Widnell, C. C. and Tata, J. R. (1964). Biochem. J. 92: 313.

2 Franke, W. W. (1974). Phil. Trans. R. Soc. Lond. B268: 67.

Figura 1.- Fotografía de núcleos aislados de hígado de rata, vistos al microscopio de luz y teñidos con azul de toluidina. 400x.

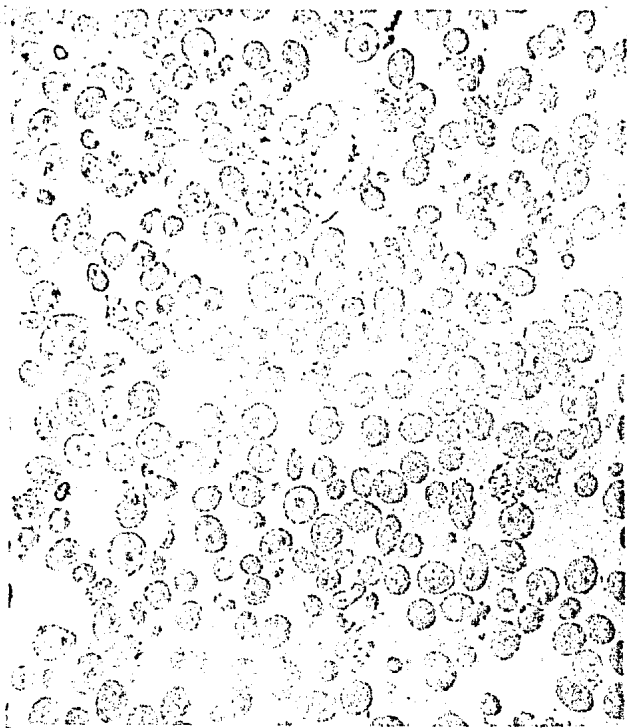


Figura 2. Micrografía electrónica de los núcleos
aislados de hígado de rata. 3 160 x.



Figura 3. Micrografía electrónica de los núcleos
aislados de hígado de rata. 14 260 x.



ron muestras del sobrenadante y, posteriormente, del extracto ácido del precipitado. Los datos presentados en la tabla II establecen que la glucosa penetra 7.07 ± 0.94 ul/mg de proteína de los 7.79 ± 0.76 ul/mg de proteína de agua total que existe en el precipitado. El dextrán, de peso molecular entre 60 000 y 90 000, penetra solamente 4.74 ± 0.64 ul/mg de proteína del agua total bajo éstas condiciones. En cambio, el valor obtenido para el calcio, 540 ± 29 ul/mg de proteína, es demasiado alto. Esto significa que la distribución del calcio en los espacios nucleares es función de la permeabilidad de la membrana nuclear al calcio, como en el caso de la glucosa o el dextrán, y de su fijación a las estructuras nucleares.

Si se acepta que el espacio o volumen del precipitado que ha sido penetrado por el dextrán corresponde al espacio extranuclear, entonces restando el agua permeable al dextrán del agua total obtendremos el agua o volumen nuclear (tabla II, inciso B). Bajo éstas circunstancias, se puede ver que 2.33 ul/mg de proteína (76.4%) del agua nuclear es permeable a la glucosa, mientras que el resto (0.72 ul/mg de proteína o 23.6%) es impermeable a ella. Si ésta agua impermeable a la glucosa corresponde al espacio o cisterna perinuclear y el resto al nucleoplasma, entonces, bajo nuestras condiciones experimentales, la membrana nuclear, tomada como unidad, es permeable a moléculas pequeñas tales como la glucosa.

FIJACION DE CALCIO A NUCLEOS: A pesar de que el estudio de permeabilidad de la membrana nuclear haya indicado que ésta es permeable a moléculas pequeñas tales como la glucosa, el estudio de la fijación de calcio a núcleos seguía siendo de interés. Ya no tanto con el fin de comprobar un transportador de calcio en el núcleo, transportador que puede existir, debido a que la membrana exterior nuclear es continuación del retículo endoplásmico, sino con el objetivo de demos

TABLA II. Distribución de los solutos marcados en los espacios nucleares.

Se incubaron los núcleos (alícuotas de 200 μ l) por 5 minutos en un medio de sacarosa 0.25M, Tris-Hepes 2mM, pH 7.4, 1mM $MgCl_2$. Agua tritiada y ^{14}C -glucosa o ^{14}C -dextran o ^{45}Ca se incluyeron en el medio de incubación, según el experimento. Los núcleos se centrifugaron en microfuga, por 3 minutos. Se decantó el sobrenadante y se extrajo el paquete con $HClO_4$ 1M. Se tomó muestra del sobrenadante y del extracto para contar radiactividad. Los resultados corresponden a la media de 2 experimentos para el ^{45}Ca , 7 para la glucosa (^{14}C), 7 para el dextran, \pm desviación estándar.

TABLA II.

EXPERIMENTAL		ul/mg de proteína
A	H ₂ O	7.79 ± 0.76
B	Permeable a la glucosa	7.07 ± 0.94
C	Permeable al dextrán	4.74 ± 0.64
D	Permeable al calcio	340.10 ± 28.99
CALCULADO		
E	Agua intranuclear (A-C)	3.05
F	Impermeable a la glucosa (A-B)	0.72 (23.6%)
G	Agua intranuclear permeable a la glucosa (E-F)	2.33 (76.4%)

trar sitios de alta afinidad para el calcio. La presencia de éstos sitios en el núcleo sugeriría la existencia de proteínas receptoras de calcio relacionadas con el efecto de éste catión sobre la síntesis de RNA y DNA. Para estudiar la fijación de calcio a núcleos, se incubaron en presencia de calcio-45 y concentraciones crecientes de calcio frío durante 10 minutos y se separaron por medio de centrifugación. Puesto que el objetivo era demostrar sitios de alta afinidad, el rango de concentraciones de calcio varió desde 2.5 nanomoles/mg de proteína, hasta 100 nanomoles/mg de proteína. No se estudiaron concentraciones más altas que ésta última.

Como puede verse en la figura 4, la fijación de calcio a núcleos fué lineal, para todas las condiciones, hasta los 60 nanomoles de calcio/mg de proteína. Por arriba de esta concentración, se pierde la linealidad. Incubando a los núcleos en ausencia de tris-hepes y disminuyendo al mínimo la concentración de magnesio (0.16 mM $MgCl_2$), se lleva a cabo la más alta fijación de calcio (Fig 4). Si se aumenta la concentración de tris-hepes hasta 2 mM, se inhibe un poco la fijación de calcio (Fig 4). Hay que tomar en consideración que el tris es un catión, y que por tanto, puede competir con el calcio por los sitios de fijación. Si además de incrementar la concentración del tris, se le añade al medio magnesio ($MgCl_2$, concentración final de 1 mM), la fijación de calcio a los núcleos se inhibe todavía más (Fig 4). El potasio, a concentraciones de 12.5 mM, compete con el calcio por los sitios de fijación (Fig 4).

Los núcleos fijaron más calcio cuando se incubaron en ausencia de inhibidores de la cadena respiratoria que cuando se incubaron en presencia de ellos (Fig 4).

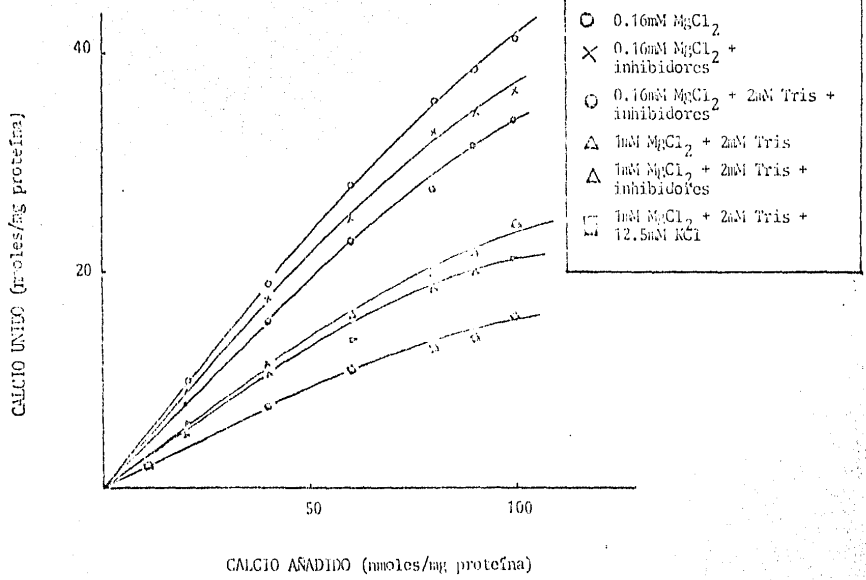
Para hallar la afinidad de los núcleos por el calcio y la cantidad de los sitios receptores/mg de proteína nuclear en cada una de las condiciones experimen-

Figura 4.- Gráfica de fijación de calcio a núcleos en función del calcio agregado al medio de incubación.

Se incubaron los núcleos con calcio-45 (14 000 cpm/tubo de microfuga) y diferentes concentraciones de calcio frío durante 10 minutos, a temperatura ambiente. Se tomaron muestras de 100 μ l, por duplicado, para conteo de radiactividad. Al finalizar el tiempo de incubación, se centrifugaron en microfuga, durante 3 minutos. Alícuotas de 100 μ l del sobrenadante se utilizaron para contar radiactividad.

○ Primero se dejaron los núcleos en presencia de sacarosa 0.25M, Tris-Hepes 2mM, pH 7.4, 1mM $MgCl_2$, antimicina (1 μ g/mg prot) y rotenona (1 μ g/mg prot) por 2 minutos. Se centrifugaron a 700 x g, 5', 0-4°C y se resuspendieron con sacarosa 0.25M, Tris-Hepes 2mM, 1mM $MgCl_2$. Luego se preincubaron en un medio con sacarosa 0.25M, Tris-Hepes 2mM, rotenona (1 μ g/mg prot), antimicina (1 μ g/mg prot) y 0.16mM $MgCl_2$, por 2 minutos, y se procedió a la incubación. X Primero se dejaron los núcleos en presencia de sacarosa 0.25M, 1mM $MgCl_2$, antimicina (1 μ g/mg prot), y rotenona (1 μ g/mg prot) por 2 minutos. Se centrifugaron a 700 x g, 5', 0-4°C y se resuspendieron con sacarosa 0.25M, 1mM $MgCl_2$. Luego se preincubaron en un medio de sacarosa 0.25M, antimicina 91 μ g/mg prot), rotenona (1 μ g/mg prot) y 0.16mM $MgCl_2$ por 2 minutos y se continuó con la incubación. ○ Primero se dejaron los núcleos en un medio de sacarosa 0.25M, 1mM $MgCl_2$, por 2 minutos. Se centrifugaron a 700 x g, 5', 0-4°C y se resuspendieron con sacarosa 0.25M, 1mM $MgCl_2$. En seguida se preincubaron en un medio de sacarosa 0.25M y concentración final de $MgCl_2$ de 0.16mM, por 2 minutos, y se siguió con la incubación. Δ Primero se dejaron los núcleos en un

medio de sacarosa 0.25M, Tris-Hepes 2mM, pH 7.4, 1mM $MgCl_2$, rotenona (1 ug/mg prot) y antimicina (1 ug/mg prot). Se centrifugaron a 700 x g, 5', 0-4°C y se resuspendieron en una solución de sacarosa 0.25M, Tris-Hepes 2mM, pH 7.4, 1mM $MgCl_2$. Luego se preincubaron en sacarosa 0.25M, Tris-Hepes 2mM, pH 7.4, 1mM $MgCl_2$, antimicina (1 ug/mg prot), rotenona (1 ug/mg prot), por 2 minutos y se prosiguió con la incubación. Δ Primero se dejaron los núcleos en presencia de sacarosa 0.25M, Tris-Hepes 2mM, 1mM $MgCl_2$, por 2 minutos. Se centrifugaron a 700 x g, 5', 0-4°C y se resuspendieron en sacarosa 0.25M, Tris-Hepes 2mM, pH 7.4, 1mM $MgCl_2$. Posteriormente se preincubaron en el mismo medio, por 2 minutos y se continuó con la incubación. \square Primero se dejaron los núcleos en presencia de sacarosa 0.25M, Tris-Hepes 2mM, pH 7.4, 1mM $MgCl_2$ por 2 minutos. Se centrifugaron a 700 x g, 5', 0-4°C y se resuspendieron en una solución de sacarosa 0.25M, Tris-Hepes 2mM, pH 7.4, 1mM $MgCl_2$, 12.5mM KCl. Luego se preincubaron en éste mismo medio con KCl por 2 minutos y se pasó a la incubación.



tales, los datos fueron analizados por medio de un análisis de Scatchard (129). En términos generales (Fig 5-10), la gráfica de Scatchard da trazos lineales, indicando que los receptores para el calcio son idénticos y se comportan independientemente unos de otros. En segundo lugar, las constantes de disociación para todos ellos son altas, deduciéndose únicamente sitios de baja afinidad (Fig 5-10 y tabla III). La fijación de calcio a éstos sitios probablemente esté dada por la interacción del calcio con los fosfolípidos de membrana nuclear y con los grupos fosfato de la molécula del DNA y RNA. Esto, al parecer, demuestra la ausencia de sitios de alta afinidad para el calcio, o bien la incapacidad de la metodología utilizada para descubrirlos (123). En tercer lugar, sobre el estudio de estos sitios de baja afinidad, se observa la acción competidora del tris, aumentando la K_d de 214 μM a 296 μM , sin alterar el total de sitios de fijación (Fig 6 y 7 y tabla III) y del potasio, que incrementa la K_d de 236 μM a 328 μM (Fig 8 y 10 y tabla III). Un efecto interesante es el del magnesio. El magnesio no altera la K_d (214 μM a 236 μM), pero sí el total de los sitios receptores/mg de proteína (155 nanomoles de calcio/mg de proteína a 68 nanomoles de calcio/mg de proteína), (Fig 6 y 8 y tabla III). Una explicación para este fenómeno sería el de postular un efecto estabilizador del magnesio sobre la estructura nuclear (121). En ausencia de magnesio, ésta estructura nuclear se daña, pierden proteínas y surgen nuevos sitios de fijación. En presencia de magnesio, la estructura se mantiene y los sitios de fijación disminuyen. En cuarto lugar, se observa que incubando a los núcleos en presencia de inhibidores de la cadena respiratoria se alteran los sitios de fijación, si el experimento se lleva a cabo a bajas concentraciones de magnesio (tabla III), y se altera la K_d si el experimento se realiza en presencia de 1 mM de HgCl_2 (tabla III). La causa de esto no la conocemos.

Figura 5. Gráfica de Scatchard para la fijación de calcio a núcleos.

Se preincubaron los núcleos en un medio de sacarosa 0.25M, 1mM $MgCl_2$ por dos minutos. Se centrifugaron a 700 x g, 5', 4°C y se resuspendieron con el mismo medio. Se preincubaron en una solución de sacarosa 0.25M, concentración final de $MgCl_2$ de 0.16 mM, por dos minutos. Se repartieron alícuotas de 500 ul a tubos de microfuga con calcio 45 (14 000 cpm/tubo) y diferentes concentraciones de calcio frío y se incubaron durante 10 minutos, a temperatura ambiente. Se tomaron muestras de 100 ul para conteo de radiactividad total. A los 10 minutos se centrifugaron en microfuga, tres minutos, tomándose alícuotas de 100 ul del sobrenadante, que se utilizaron para contar radiactividad. Los puntos experimentales representan la media de tres experimentos.

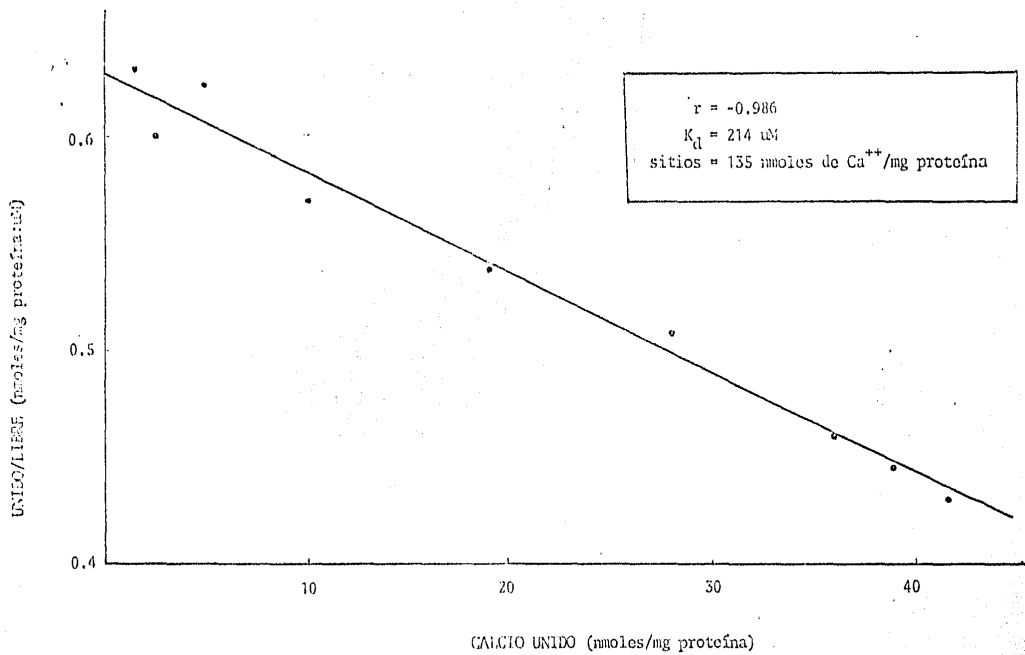
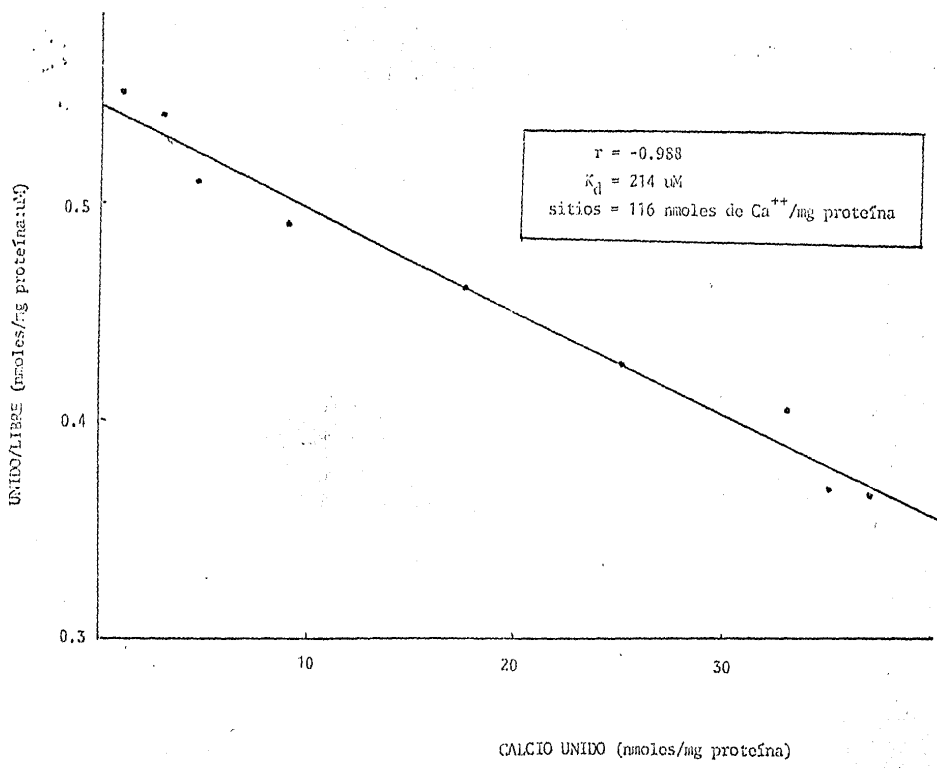


Figura 6. Gráfica de Scatchard para la fijación de calcio a núcleos. Efecto de la Rotenona y Antimicina sobre la fijación.

Se preincubaron los núcleos en un medio de sacarosa 0.25M, 1mM $MgCl_2$, Antimicina (1 ug/mg Prot.) y Rotenona (1 ug/mg Prot) y 0.16 mM $MgCl_2$, por dos minutos. Se centrifugaron a $700 \times g$, 5', 0-4°C y se resuspendieron con sacarosa 0.25M, 1mM $MgCl_2$. Se preincubaron en una solución de sacarosa 0.25M, antimicina (1 ug/mg prot.), Rotenona (1 ug/mg Prot.) y 0.16mM $MgCl_2$ por dos minutos. Se repartieron alícuotas de 500 ul a tubos de microfuga con calcio-45 (14 000 cpm/tubo) y diferentes concentraciones de calcio frío y se incubaron durante 10 minutos, a temperatura ambiente. Se tomaron muestras de 100 ul para conteo de radiactividad total. A los 10 minutos se centrifugaron en microfuga, 3 minutos. Alícuotas de 100 ul de sobrenadante se utilizaron para contar radiactividad. Los puntos experimentales representan la media de cuatro experimentos.



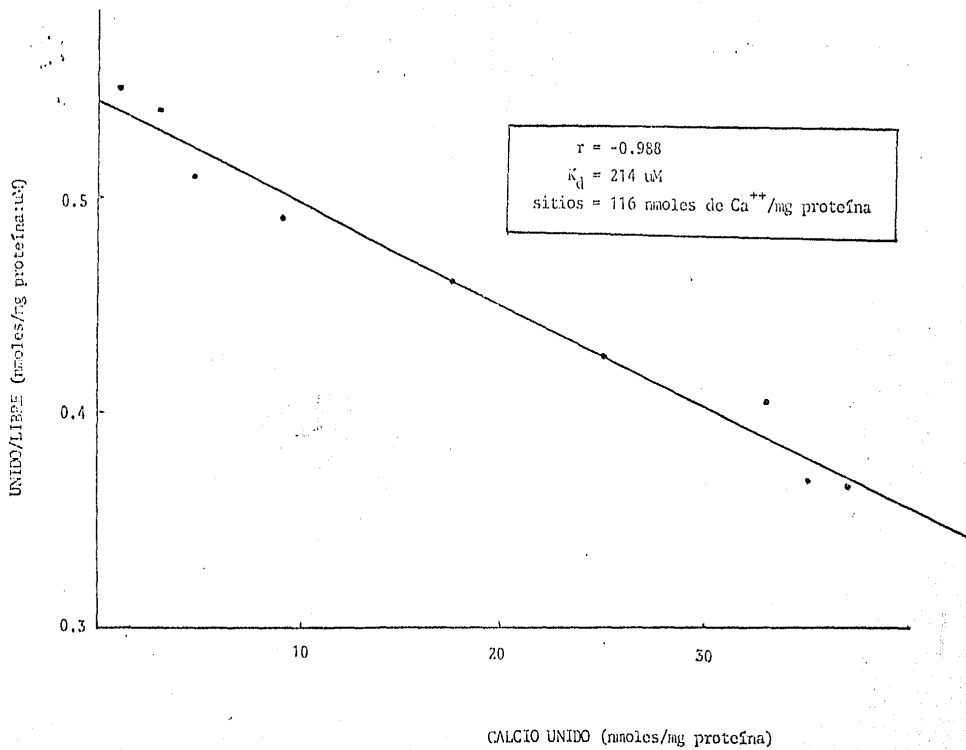


Figura 7. Gráfica de Scatchard para la fijación de calcio de núcleos. Efecto del Tris sobre la fijación de calcio.

Se preincubaron los núcleos en presencia de sacarosa 0.25M, Tris-Hepes 2mM, pH 7.4, 1mM MgCl₂, Antimicina (1 ug/Mg Prot.), y Retenona (1 ug/mg Prot.) por dos minutos. Se centrifugaron a 700 x g 5', 0-4°C y se resuspendieron con sacarosa 0.25M, Tris-Hepes 2mM pH 7.4, 1mM MgCl₂. Se preincubaron en un medio con sacarosa 0.25M Tris-Hepes 2mM pH 7.4, Retenona (1 ug/mg Prot.), Antimicina (1 ug/mg Prot.) y 0.16 mM MgCl₂ por dos minutos. Se repartieron alícuotas de 500 ul a tubos de microfuga con calcio 45 (14 000 cpm/ tubo) y diferentes concentraciones de calcio frío y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se tomaron muestras de 100 ul para conteo de radiactividad total. A los 10 minutos se centrifugaron en microfuga, tres minutos. Alícuotas de 100 ul del sobrenadante se utilizaron para contar radiactividad. Los puntos experimentales representan la media de cinco experimentos.

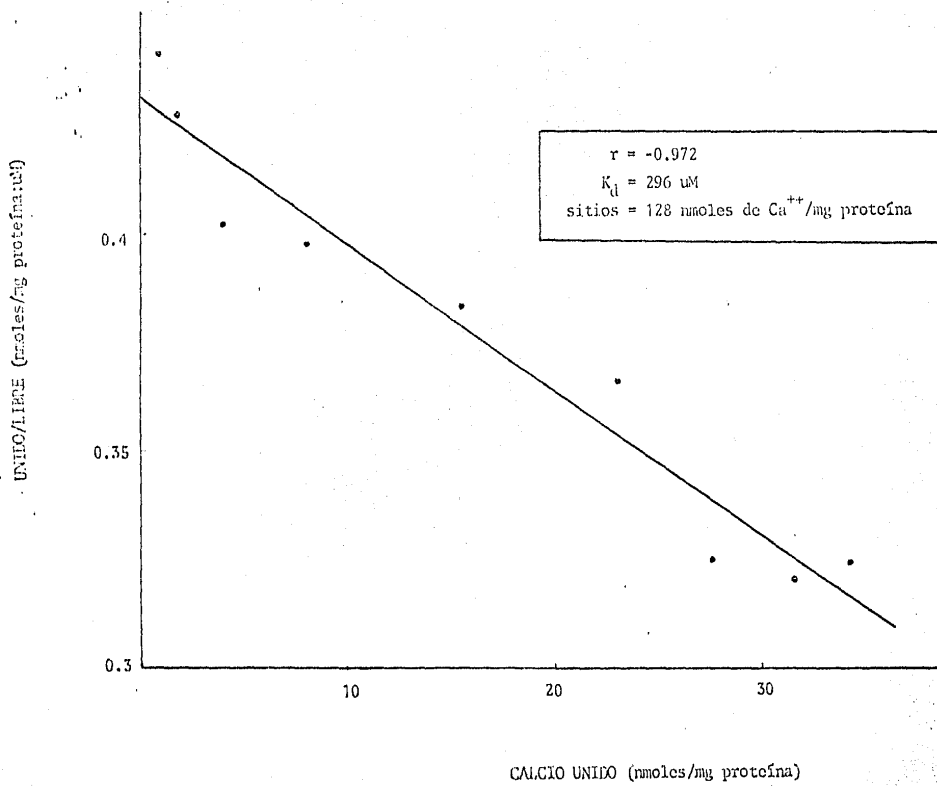


Figura 8. Gráfica de Scatchard para la fijación de calcio a núcleos. Efecto del magnesio sobre la fijación de calcio.

Se preincubaron los núcleos en un medio de sacarosa 0.25M, Tris-Hepes 2mM pH 7.4, 1mM $MgCl_2$, por dos minutos. Se centrifugaron a $700 \times g$, 5', 0-4°C y se resuspendieron en el mismo medio. Se preincubaron por dos minutos en el medio de resuspensión y se repartieron alícuotas de 500 ul a tubos de microfuga con calcio 45 (14 000 cpm/tubo) y diferentes concentraciones de calcio frío y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se tomaron muestras de 100 ul para conteo de radiactividad total. A los 10 minutos se centrifugaron en microfuga, tres minutos. Alícuotas de 100 ul del sobrenadante se utilizaron para contar radiactividad. Los puntos experimentales representan la media de dos experimentos.

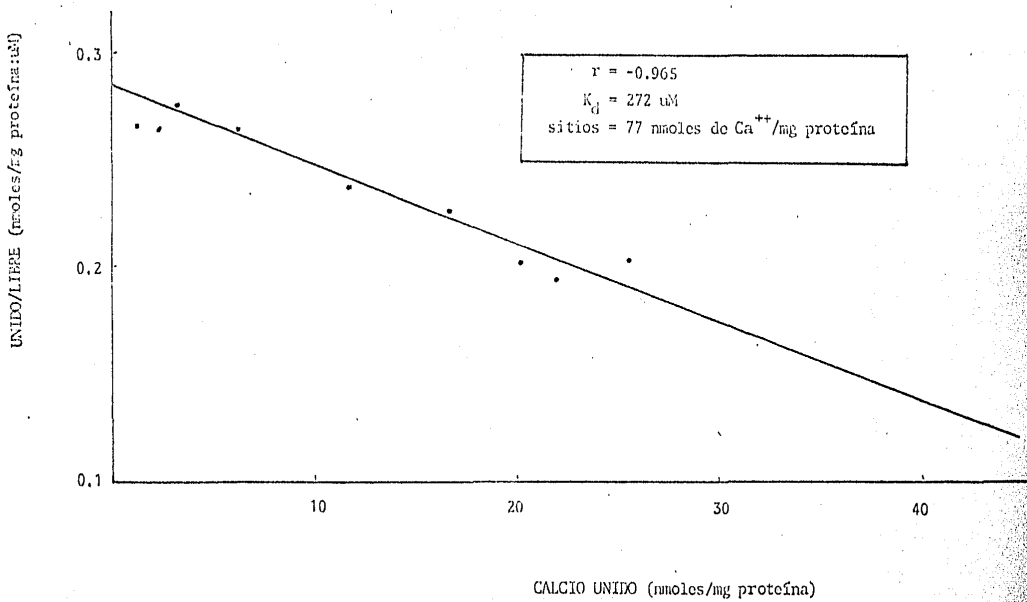


Figura 9. Gráfica de Scatchard para la fijación de calcio a núcleos. Efecto de la Rotenona y antimicina sobre la fijación de calcio.

Se preincubaron los núcleos en un medio de sacarosa 0.25M, Tris-Hepes 2mM, pH 7.4, 1mM MgCl₂, Rotenona (1 ug/mg Prot) y Antimicina (1 ug/mg Prot). Se centrifugaron a 700 x g, 5', 0-4°C y se resuspendieron en una solución de sacarosa 0.25M, Tris-Hepes 2mM, pH 7.4, 1mM MgCl₂. Se preincubaron en sacarosa 0.25M, Tris-Hepes 2mM, pH 7.4, 1mM MgCl₂, Rotenona (1 ug/mg Prot.), Antimicina (1 ug/mg Prot.), por dos minutos. Se repartieron alícuotas de 500 ul a tubos de microfuga con calcio 45 (14 000 cpm/tubo) y diferentes concentraciones de calcio frío y se incubaron durante 10 minutos, a temperatura ambiente. Se tomaron muestras de 100 ul para conteo de radiactividad total. A los 10 minutos, se centrifugaron en microfuga, tres minutos. Alícuotas de 100 ul del sobrenadante se utilizaron para contar radiactividad. Los puntos experimentales representan la media de tres experimentos.

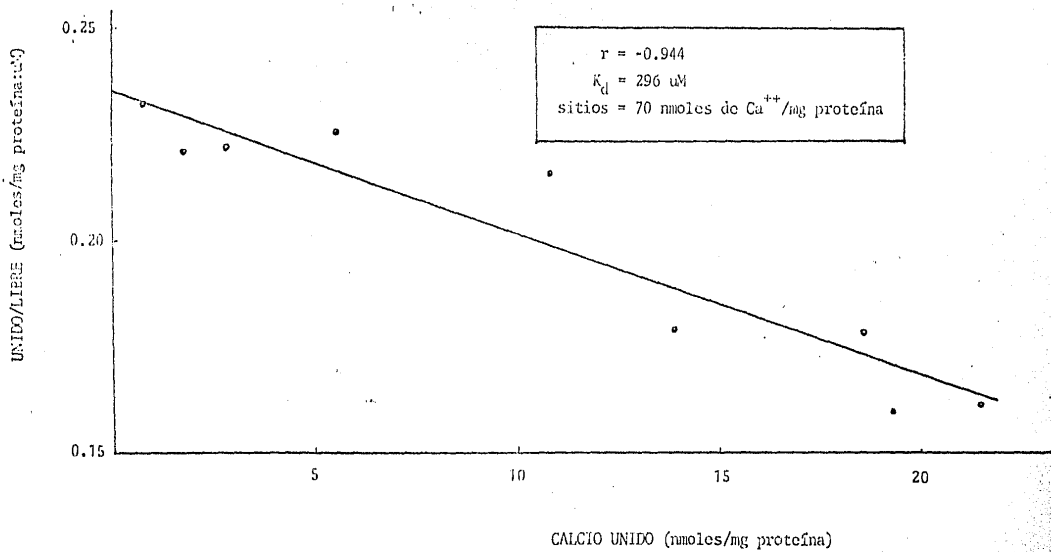


Figura 10. Gráfica de Scatchard para la fijación de calcio a núcleos. Efecto del potasio sobre la fijación de calcio.

Se preincubaron los núcleos en presencia de sacarosa 0.25M, Tris-Hepes 2mM, pH 7.4, 1mM $MgCl_2$ por dos minutos. Se centrifugaron a $700 \times g$, 5', 0-4°C y se resuspendieron en una solución de sacarosa 0.25M, Tris-Hepes 2mM, pH 7.4, 1mM $MgCl_2$, 12.5 μM KCl. Se preincubaron en este mismo medio por 2 minutos y se repartieron alícuotas de 500 μl a tubos de microfuga con calcio 45 (14 000 cpm/tubo) y diferentes concentraciones de calcio frío y se incubaron durante 10 minutos, a temperatura ambiente. Se tomaron muestras de 100 μl para conteo de radiactividad total. A los 10 minutos se centrifugaron en microfuga, tres minutos. Alícuotas de 100 μl del sobrenadante se utilizaron para contar radiactividad. Los puntos experimentales representan la media de dos experimentos.

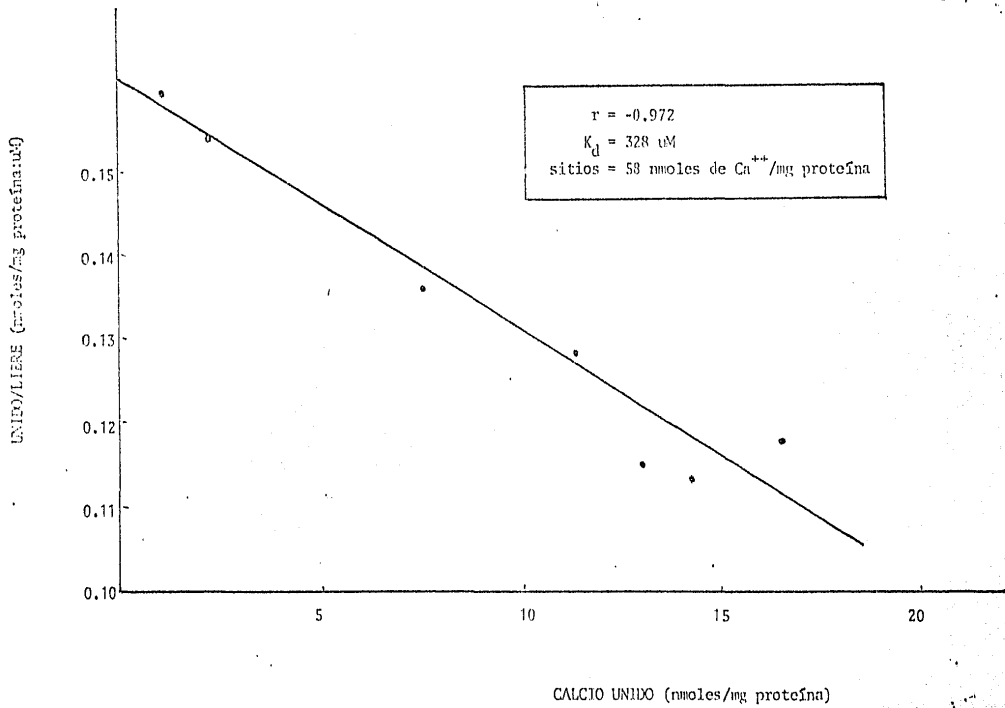


TABLA III. Resumen de las constantes de disociación y las capacidades totales de fijación. Las condiciones experimentales se describen en la fig. 4. Las unidades de las K_d se dan en μM . La capacidad total de fijación se mide en nanomoles de calcio/mg proteína.

TABLA III

-CONDICION EXPERIMENTAL	K_d uM	CAPACIDAD TOTAL DE FIJACION - nmoles/mg de proteína.
0.16 mM $MgCl_2$	214	135
0.16 mM $MgCl_2$ + inhibidores	214	116
0.16 mM $MgCl_2$ + 2 mM Tris + inhibidores.	296	128
1 mM $MgCl_2$ + 2 mM Tris	272	77
1 mM $MgCl_2$ + 2 mM Tris + inhibidores	296	70
1 mM $MgCl_2$ + 2 mM Tris + 12.5 mM KCl	328	58

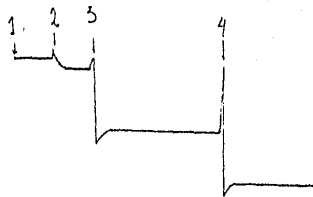
TRANSPORTE DE CALCIO POR NUCLEOS: Como se puede observar en la figura 4, los núcleos fijaron más calcio cuando se incubaron en ausencia de inhibidores de la cadena respiratoria que cuando se incubaron en presencia de ellos. Esto daba lugar a la posibilidad de que los núcleos pudieran transportar calcio. Para averiguar si los núcleos transportaban calcio, se incubaron en un medio de sacarosa 0.25 M, tris-hepes 2 mM pH 7.4, 1 mM de $MgCl_2$, 100 μM de murexida, 0.4 mM de ATP a temperatura ambiente y se midió el transporte de calcio espectro fotométricamente (124). Como puede verse en la figura 11, los núcleos no transportaron calcio cuando se enrgizaron con ATP.

EFFECTO DEL CALCIO Y LA CALMODULINA SOBRE LA SINTESIS DE RNA: Con el objetivo de estudiar el efecto del calcio sobre la cinética de la síntesis de RNA, se incubaron los núcleos en presencia de 1.25 mM EGTA o 0.125 mM $CaCl_2$ por tiempos variables. Como se muestra en la figura 12, la velocidad inicial de síntesis de RNA fue menor en presencia de calcio que en presencia de EGTA. Incubaciones por tiempos más largos no fueron estudiados debido a que la reacción de incorporación del UTP(3H) no depende unicamente de la iniciación de la síntesis de RNA, sino tambien de la elongación de la cadena (131). El calcio también disminuye la incorporación máxima de UTP(3H) (ver fig 12 y tabla IV), sugiriendo un descenso en el numero total de sitios activos de iniciación de síntesis de RNA. Puesto que el calcio participa en una gran variedad de procesos a través de su unión con la calmodulina (13-15), se estudió también el efecto de esta proteína sobre la inhibición de la síntesis de RNA mediada por calcio. Dos tipos de experimentos fueron hechos. En uno de ellos, la calmodulina estuvo presente en la mezcla de incubación. En el otro, se hizo uso de la clorpromazina, un inhibidor específico de los procesos dependientes de calmodulina (26). Como se muestra en la tabla IV, la inhibición de la síntesis

Figura 11: Transporte de calcio por núcleos aislados de hígado de rata.

Los núcleos fueron colocados en un medio de saca rosa 0.25M. Tris-Hepes 2mM (pH 7.4), 1mM $MgCl_2$, 0.4 mM ATP, 100 μ M murexida, a una concentración de 15 mg de proteína/3ml. El experimento se realizó a temperatura ambiente. El transporte de calcio se monitorizó espectrofotométricamente, tomándose el par de longitudes de onda: 540-507 nm. El transporte de calcio se inició añadiendo al medio de incubación alícuotas de una solución de $CaCl_2$.

↑
TRANSPORTE
DE
CALCIO



ΔA = 0.01

- 1: NUCLEOS + ATP
- 2: AGITACION
- 3: 100 μ M CaCl_2
- 4: 100 μ M CaCl_2

Tabla IV. Efecto de los iones de calcio y la calmodulina sobre la síntesis de RNA en núcleos aislados de hígado de rata.

Condiciones de Incubación	Síntesis de RNA % actividad
1. EGTA	100
2. Ca^{++}	62.9
3. Ca^{++} más Calmodulina	61.2
4. Ca^{++} más Calmodulina más Clorpromacina	63.1

Los nucleos fueron incubados por 20 minutos en presencia de:

- 1.- 1.25 mM EGTA,
- 2.- 0.125 mM CaCl_2 ,
- 3.- 0.125 mM CaCl_2 más 1 uM calmodulina,
- 4.- 0.125 mM CaCl_2 más 1 uM calmodulina más 0.25 mM clorpromacina.

La síntesis de RNA se midió como se describe en Procedimiento Experimental. Los resultados son la media de tres experimentos independientes.

Figura 12. Efecto del calcio sobre la síntesis de RNA.

Se incubaron los núcleos en presencia de 1.25 mM EGTA (\blacktriangle) ó 0.125 mM CaCl_2 (\circ) por diferentes tiempos. La síntesis de RNA se midió como se describe en Procedimiento Experimental. El valor del tiempo cero se sustrajo de los demás valores. Los resultados son la media de tres experimentos realizados en diferentes días.

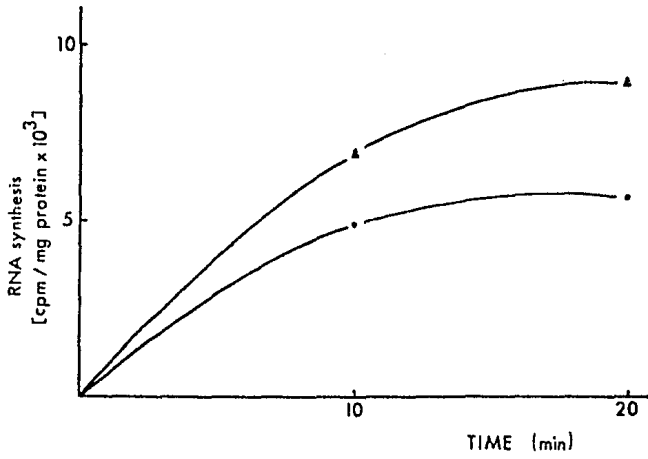
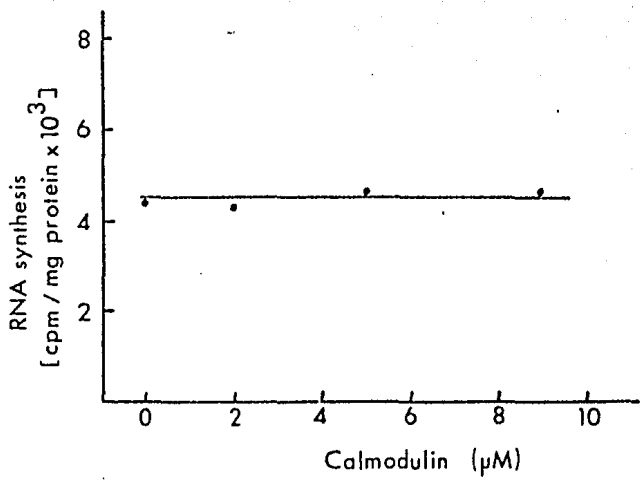


Figura 13. Efecto de la calmodulina sobre la síntesis de RNA.

Se incubaron los núcleos por 20 minutos en presencia de 5 μM CaCl_2 y diferentes concentraciones de calmodulina. La síntesis de RNA fué medida como se describió. Los resultados son la media de dos experimentos separados.



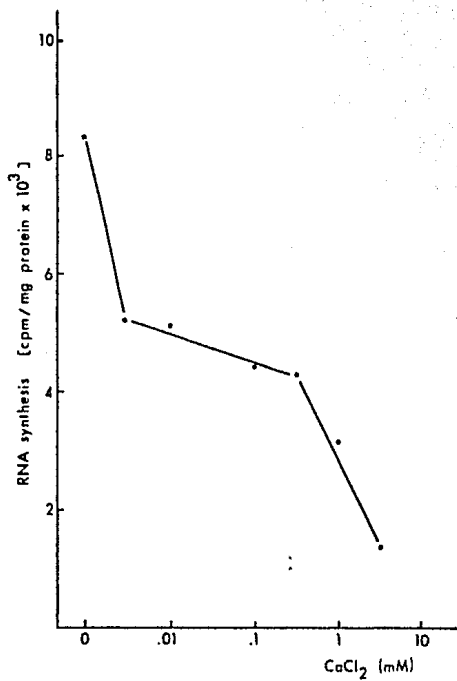
sis de RNA por calcio no fue alterada por la presencia de la calmodulina o la clorpromazina. La concentración de calmodulina se varió desde 0 a 10 μM sin un efecto detectable sobre la inhibición mediada por calcio (Fig 13).

EFFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CALCIO SOBRE LA SINTESIS DE RNA:

La síntesis de RNA se estudió incubando los núcleos en presencia de diferentes concentraciones de calcio. Como se muestra en la figura 14, el calcio inhibe la síntesis de RNA en dos rangos de concentración, el menor entre 0-10 μM , y el más alto por arriba de los 0,5 mM.

Figura 14. Efecto de diferentes concentraciones de calcio sobre la síntesis de RNA.

Se incubaron los nucleos por 20 minutos en presencia de diferentes concentraciones de calcio. La síntesis de RNA se ensayó como se describe en Procedimiento Experimental. El valor máximo de síntesis de RNA se obtuvo incubando a los núcleos en presencia de 1.25 mM EGTA. Los resultados son la media de tres experimentos.



DISCUSION

Por criterios químicos y enzimáticos, se demostró la pureza de los núcleos (tabla I). No hubo diferencias significativas entre nuestros resultados y los reportados en la literatura (tabla I).

El estudio de microscopía óptica y electrónica mostró la integridad de los núcleos (Fig 1, 2 y 3). Estos, al estudio de microscopía electrónica, presentaron uno o varios nucleolos, una doble membrana con su espacio perinuclear, algunos poros y el nucleoplasma con la cromatina en su interior (Fig 1 y 2). Pensamos que era importante comprobar antes la integridad de los núcleos y su pureza para los estudios subsiguientes, como eran la distribución de los solutos marcados en los volúmenes nucleares, la fijación y el transporte de calcio por éstos organelos y la síntesis de RNA.

Bajo nuestras condiciones experimentales, 2.33 ul/mg de proteína (76.4%) del agua nuclear es permeable a la glucosa, y el resto (0.72 ul/mg de proteína o 25.6%) es impermeable a ella (tabla II). Esto da lugar a dos volúmenes nucleares. Si se acepta que el agua impermeable a la glucosa mide el espacio o cisterna perinuclear, entonces el resto (2.33 ul/mg de proteína) corresponde al nucleoplasma. Luego pues, la membrana nuclear, tomada como unidad funcional, es permeable a pequeñas moléculas tales como la glucosa e impermeable a grandes moléculas, como el dextrán. Indirectamente, esto significa que la membrana nuclear es permeable al calcio bajo nuestras condiciones experimentales. Estos datos de permeabilidad de la membrana nuclear confirman los estudios llevados a cabo por Horowitz y colaboradores (133). Por otra parte, la distribución del calcio en los espacios nucleares se complica debido a que hay estructuras nucleares que fijan calcio: fosfolípidos de membrana y grupos fosfato del DNA y

RNA. Y es esta la causa de los 340 ul/mg de proteína obtenidos para el calcio en el estudio de distribución de solutos en los volúmenes nucleares (tabla II).

Al estudio de fijación de calcio por los nucleos se halló que: 1.- Las gráficas de Scatchard dan trazos lineales, indicando que los receptores para el calcio son idénticos y se comportan en forma independiente unos de otros (Fig 5-10); 2.- Estos receptores son sitios de baja afinidad (tabla III); 3.- El tris y el potasio compiten con el calcio por estos sitios de baja afinidad (tabla III). La sensibilidad del calcio fijado al tris y al potasio sugiere que los sitios de fijación son los grupos polares de los fosfolípidos de membrana y los grupos polares del DNA y RNA (125); 4.- El magnesio altera el número de sitios de baja afinidad (tabla III). Una posible explicación a este fenómeno se basa en el papel estabilizador del magnesio sobre la estructura nuclear (121); 5.- No se demostraron sitios de alta afinidad. Sin embargo, estos sitios de alta afinidad para el calcio existen en el nucleos. Martonosi y colaboradores, utilizando otro diseño experimental, demuestra la presencia de sitios de alta afinidad para el calcio en núcleos de hígado de rata (134); 6.- La posibilidad de transporte de calcio por los nucleos que se deriva de la figura 4, donde se observa la disminución de la fijación de calcio en presencia de rotenona y antimicina, no se pudo demostrar en el estudio de transporte de calcio (fig 11).

Por otra parte, en este trabajo nosotros hemos demostrado una acción inhibitoria del calcio sobre la síntesis de RNA. Se debe mencionar, sin embargo, que estos resultados estan en desacuerdo con algunos reportes (11,130,131), en los cuales el efecto opuesto ha sido descrito. En este trabajo, nosotros hemos usado núcleos aislados, en lugar de rebanadas (11), o cultivo de células (130,131). Las diferencias en los modelos experimentales pueden explicar, en

parte, el desacuerdo de los resultados. La acción activadora del calcio en rebanadas o cultivo de células puede ser un fenómeno más complejo que la simple interacción del ion con alguna proteína nuclear, como ha sido propuesto por Martonosi y col. (134).

La concentración de calcio en el citosol y probablemente en el nucleosol, es 1 μM o menos (21). Como se muestra en la figura 14, un primer rango de inhibición aparece usando concentraciones de calcio dentro de éste mismo orden de magnitud. Estos datos sugieren que la acción inhibitoria del calcio sobre la síntesis de RNA puede ser significativa in vivo.

Puesto que el calcio activa una gran variedad de procesos a través de la formación de un complejo con la calmodulina (15-15), nosotros también estudiamos la influencia de esta proteína y del inhibidor de los procesos dependientes de calmodulina, la clorpromazina (26). Los resultados obtenidos muestran que el efecto del calcio fue independiente de la calmodulina.

Con respecto a la inhibición de la síntesis de RNA producida por altas concentraciones de calcio, se ha reportado que el daño hepático producido por la falidina depende de la presencia de calcio en el medio (135). Por tanto, es posible que la inhibición de la síntesis de RNA a altas concentraciones de calcio sea uno de los eventos involucrados en el proceso del daño hepático por agentes tóxicos.

CONCLUSION

Bajo nuestras condiciones experimentales, los núcleos son permeables a moléculas pequeñas tales como la glucosa, e impermeables a moléculas grandes como el dextrán ($M_n = 60\ 000$ a $90\ 000$). Posiblemente, aunque la técnica no lo detecta, el núcleo es permeable al calcio. Estos resultados concuerdan con los de la literatura (133). Por tanto, concluimos que la concentración de calcio en el núcleo es un reflejo de la concentración de calcio en el citoplasma.

Por otra parte, en este estudio no demostramos la presencia de sitios de alta afinidad para el calcio en núcleo celular. La causa de esto se debe a la limitación de la técnica utilizada (125). Reed y col. sugieren que actualmente no existe metodología capaz de obtener datos, con la suficiente precisión, de las concentraciones de calcio unido y calcio libre a los bajísimos valores requeridos para tales experimentos (125). Sin embargo, el grupo de Martonosi, utilizando otro diseño experimental, demuestra la presencia de sitios de alta afinidad en el núcleo (134). En este artículo, Martonosi discute la posibilidad de que éstas proteínas que fijan calcio con alta afinidad, tengan un papel en la síntesis de RNA (134).

Finalmente, en este trabajo demostramos que el calcio inhibe la síntesis de RNA en núcleos aislados de hígado de rata, y que este efecto del calcio es independiente de la calmodulina.

AGRADECIMIENTOS

Deseo dar las gracias al Dr Alfonso Cárabez Trejo y a Jorge Sepúlveda por su ayuda en el procesamiento de las muestras para microscopía óptica y electrónica.

También quiero, aquí, agradecerle a Elsa el trabajo de mecanografía realizado en el artículo que saldrá publicado en el Febs Lett.

BIBLIOGRAFIA

1. Junqueira, L. C. and Carneiro, J. Basic Histology, 3a. Ed. Lange Medical Publications. California. 1980.
2. Dustin, P. (1980). Sci. Amer. 243: 58-79.
3. Schwartz, J. H. (1980). Sci. Amer. 242: 122-135.
4. Anderton, B. (1980). Nature, 283: 716.
5. Harris, J. R. (1978). Biochim. Biophys. Acta. 515: 55-104.
6. Sagara, Y., Harano, T. and Omura, T. (1978). J. Biochem 83: 807-812.
7. Franke, W. W. (1974). Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 268: 67-93.
8. Kornberg, R. R. and Klug, A. (1981). Sci. Amer. 244: 48-69.
9. Lehninger, A. L. Biochemistry, 2a Ed. Worth Publishers Inc. New York. 1975.
10. Whitfield, J. F., MacManus, J. P., Boynton, A. L., Gillan D. J. and Isaacs, R. J. (1974). J. Cell. Physiol. 84: 445-458.
11. Kaplan, E. and Richman, H. G. (1975). Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 142: 487-489.
12. Rasmussen, H. and Goodman, D. B. P. (1977). Physiol. Rev. 57: 421-489.
13. Klee, C. B., Crouch, T. H. and Richman, P. G. (1980) Ann. Rev. Biochem. 49: 489-516.
14. Means, A. R. and Dedman, J. R. (1980). Nature. 285: 73-77.
15. Cheung, W. Y. (1980). Science. 207: 19-27.
16. Kretsinger, R. H. (1976) Ann. Rev. Biochem. 45: 239-66.
17. Ebashi, S. (1972). Nature. 240: 217-218.
18. Ebashi, S. (1976). Ann. Rev. Physiol. 38: 293-314.
19. Spence, R. J., Sheppard, M. S., Kraiser, J. (1980). Endocrinology. 3: 764-769.

20. Sharma, R. K., Wang, T. H., Wrich, E. and Wang, J. H. (1980). *J. Biol. Chem.* 255: 5916-5923.
21. DeLorenzo, R. J. and Freedman, S. D. (1977). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 77: 1036-1046.
22. DeLorenzo, R. J. and Freedman, S. D. (1978). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80: 183-192.
23. Schulman, H. and Greengard, P. (1978). *Nature.* 271: 478-479.
24. Watterson, D. M., Sharief, F. and Vanaman, T. C. (1980) *J. Biol. Chem.* 255: 962-975.
25. Klee, C. B. (1977). *Biochemistry.* 16: 1017-1024.
26. Levin, R. M. and Weiss, B. (1976). *Mol. Pharmacol.* 12: 581-589.
27. Zalman, L. S., Nikaido, H. and Kagawa, Y. (1980). *J. Biol. Chem.* 255: 1771-1774.
28. Koroscil, T. M. and Gallant, S. (1980). *J. Biol. Chem.* 255: 6276-6283.
29. Turner, R. T., Bothamiller, B. L., Howard, G. A. and Baylink, D. J. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77: 1537-1540.
30. Mitchell, P. (1979). *Eur. J. Biochem.* 95: 1-20.
31. Bygrave, F. L. (1978). *Biol. Rev.* 53: 43-79.
32. Carafoli, E. and Crompton, M. In: *Current topics in Membrane and Transport.* Bronner, F. and Kleinzeller, R. Eds. Vol 10, pag: 151-216. Academic Press Inc. N. Y. 1978.
33. Lehninger, A. L., Carafoli, E. and Rossi, C. S. (1969). *Adv. Enzymol.* 29: 259-320.
34. Lehninger, A. L. (1970). *Biochem. J.* 119: 129-138.
35. Nicholls, D. G. (1978). *Biochem. J.* 176: 463-474.
- 35a. Reed, K. C. and Bygrave, F. L. (1974). *Biochem. J.* 142: 555-566.
36. Lehninger, A. L., Vercesi, A. and Bababunmi, E. A. (1978). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75: 1690-1694.
37. Fiskum, G. and Lehninger, A. L. (1979). *J. Biol. Chem.* 254: 6236-6239.
38. Tsokos, J., Cornwell, T. F. and Vlasuk, G. (1980). *Febs. Lett.* 119: 297-300.

39. Crompton, M., Moser, R., Ludi, H. and Carafoli, E. (1978) Eur. J. Biochem. 82: 25-31.
40. Caroni, P., Schwerzmann, K. and Carafoli, E. (1978). Febs. Lett. 96: 339-352.
41. Carafoli, E. (1979). Febs. Lett. 104: 1-5.
42. Nicholls, D.G. and Crompton, M. (1980). Febs. Lett. 111: 261-268.
43. Haworth, R.A., Hunter, D.R. and Berkoff, H.A. (1980). Febs. Lett. 110: 216-218.
44. Prpé, V. and Bygrave, F. L. (1980). J. Biol. Chem. 255: 6193-6199.
45. Murphy, E., Coll, K., Rich, T. L. and Williamson, J. R. (1980). J. Biol. Chem. 255: 6600-6608.
46. Bygrave, F. L. (1978). Biochem. J. 170: 87-91.
47. Taylor, W. M., Bygrave, F. L., Blackmore, P. F. and Exton, J. H. (1979). Febs. Lett. 104: 31-34.
48. Andia Waltenbaugh, A. M., Lam, A., Hummel, L. and Friedmann, N. (1980). Biochim. Biophys. Acta. 630: 165-175.
49. Taylor, W. M., Feinbart, P., Hunt, N. H. and Bygrave, F. L. (1980). Febs. Lett. 112: 92-96.
50. Iyengar, R. and Brinbauer, L. (1979). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 3189-3193.
51. Croke, M. J. and Sneyd, J. G. T. (1980). Biochim. Biophys. Acta. 631: 40-48.
52. Rae, P. A., Gutmann, N. S., Tsao, J. and Schimner, B. P. (1979). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 1896-1900.
53. LePeuch, C. J., Guilleux, J. C. and Demaille, J. G. (1980) Febs. Lett. 114: 165-168.
54. Martonosi, A. and Feretos, R. (1964). J. Biol. Chem. 239: 648-658.
55. Martonosi, A. and Feretos, R. (1964). J. Biol. Chem. 239: 659-668.
56. MacLennan, D. H. and Holland, D. C. (1975). Ann. Rev. Biophys. Biogeng. 4: 377-404.

57. Hasselbach, W. (1978). *Biochim. Biophys. Acta.* 515: 23-53.
58. Shoshan, V., Campbell, K. P., MacLennan, D. H., Frodis, W. and Britt, B. A. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77: 4435-4438.
59. Lynch, T. J. and Cheung, W. Y. (1979). *Arch. Biochem. Biophys.* 194: 165-170.
60. Hinds, T. R., Larsen, F. L. and Vincenzi, F. F. (1978). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 81: 455-461.
61. Larsen, F. L. and Vincenzi, F. F. (1979). *Science.* 204: 306-309.
62. Haaker, H. and Racker, E. (1979). *J. Biol. Chem.* 242: 6598-6602.
63. Bandt, N. R., Caswell, A. H. and Brunschwing, J. P. (1980). *J. Biol. Chem.* 255: 6290-6298.
64. Miyamoto, H. and Racker, E. (1980). *J. Biol. Chem.* 255: 2656-2658.
65. Kehoe, J. and Marty, A. (1980). *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 9: 437-465.
66. Mazia, D. (1974). *Sci. Am.* 230: 54-64
67. Pardee, A. B., Dubrow, R., Hamlin, J. L. and Kletzien, R. F. (1978). *Ann. Rev. Biochem.* 47: 715-750.
68. Otto, A.M., Zumbó, A., Bibson, L., Kublen, A. M. and Jiménez de Asua, L. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 6435-6438.
69. Dicker, P. and Rozengurt, E. (1978). *Nature.* 276: 723-726.
70. Roberts, A. B., Lamb, L. C., Newton, D. L., Sporn, M. B., DeLarco, J. E. and Todaro, G. J. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77: 3494-3498.
71. Azizkhan, J. C. and Klagsbrun, M. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77: 2762-2766.
72. Nitsch, L. and Wollman, S. H. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77: 2743-2747.
73. Gospođarowicz, B. and Ill, C. R. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 77: 2726-2730.
74. Ess, M. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 77: 112-116.
75. Parker, C. W. (1975). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 61: 1180-1186.
76. Maino, V. C., Green, N. M. and Crumpton, M. L. (1974) *Nature.* 251: 324-327.

77. Damluji, R. and Riley, P. A. (1979). *Exp. Cell. Biol.* 47: 446-453.
78. Paul, D. and Ristow, H. J. (1979). *J. Cell. Biol.* 98: 31-40.
79. Tupper, J. T. and Zorogniotti, F. (1977). *J. Cell. Biol.* 75: 12-22.
80. Swierenga, S. H., Whitfield, J. F. and Karasaki, S. (1978). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75: 6069-6072.
81. Harper, J. F., Cheung, W. Y., Wallace, R. W., Huang, H. L., Levine, S. N. and Steiner, A. L. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77: 366-370.
82. Sikorska, M., Mac Manus, J. P., Walker, P. R. and Whitfield, J. F. (1980). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 93: 1196-1203.
83. Boynton, A. L., Withfield, J. F. and Mac Manus, J. P. (1980). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95: 745-749.
84. Ishida, R., Akiyoshi, H. and Takahashi, T. (1979). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 56: 703-710.
85. Burzio, L. and Koide, S. S. (1973). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 53: 572-579.
86. Hewish, D. R. and Burgoyne, L. A. (1973). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 52: 475-481.
87. Yoshihara, K., Tanigawa, Y., Burzio, L. and Koide, W. S. (1975). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72: 289-293.
88. Tanigawa, Y., Yoshihara, K., and Koide, S. S. (1974) *BBRC Biochem. Biophys. Res. Commun.* 59: 935-940.
89. DePamphilis, M. L. and Wasserman, P. M. (1980). *Ann. Rev. Biochem.* 49: 627-666.
90. Sheinin, R., Humbert, J. and Pearlman, R. E. (1978). *Ann. Rev. Biochem.* 47: 277-316.
91. Ogawa, T., and Okazaki, T. (1980). *Ann. Rev. Biochem.* 49: 421-458.
92. Avila, J. (1980). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 92: 231-246

93. Muller, W. W. G., Geurtsen, W., Zahn, R. K. and Arendes, S. (1980). *Febs. Lett.* 110: 119-122.

94. Champoux, J. J. (1978). *Ann. Rev. Biochem.* 47: 449-480.

95. Muller, B., and Reinhard, P. (1980) *Febs. Lett.* 113: 61-64.

96. Wickner, S. H. (1978). *Ann. Rev. Biochem.* 47: 1163-1192.

97. Isenberg, I. (1979). (1979). *Ann. Rev. Biochem.* 48: 159-192.

98. Block, J. A. and Atkinson, B. G. (1979). *Cell. Dif.* 8: 413-420.

99. Mazia, D., Petzelt, C., Williams, R. O. and Meza, I. (1972) *Exp. Cell. Res.* 70: 325-332.

100. Welsh, M. J., Dedman, J. R., Brinkley, B. R. and Means, A. R., (1978). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75: 1867-1871.

101. Marcum, J. M., Dedman, J. R., Brinkley, B. R. and Means, A. R. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75: 3771-3775.

102. Petzelt, C., and Von Ledebur-Villiguer, M. (1975). *Exp. Cell. Res.* 81: 87-94.

103. Petzelt, C. and Avel, D. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79: 1610-1613.

104. Adhya, S., and Gottesman, M. (1978). *Ann. Rev. Biochem.* 97: 967-996.

105. Baxter, S. D., and Funder, J. W. (1979). *New Engl. J. Med.* 301: 1149-1161.

106. Chan, L. and O'Malley, B. W. (1976). *N. Engl. J. Med.* 294: 1322-1328.

107. Chan, L. and O'Malley, B. W. (1976). *N. Engl. J. Med.* 294: 1372-1381.

108. Chan, L. and O'Malley, B. W. (1976). *N. Engl. J. Med.* 294: 1430-1381.

109. Kumakura, K., Guidotti, A. and Iosta, E. (1979). *Mol. Pharmacol.* 16: 865-876.

110. Dokas, L., Rittschof, D. and Kleinsmith, L. J. (1978). *Arch. Biochem. Biophys.* 191: 578-589.

111. Kleinsmith, L. J. (1975). *J. Cell. Physiol.* 85: 459-475.

112. Jungmann, R. A. and Rossell, D. H. (1977). *Life Sciences* 20: 1787-1798.

113. Kanungo, M. S. and Thakur, M. K. (1977). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 79: 1031-1036.
114. Sagara, Y., Harano, T. and Omura, T. (1978). *Biochem. J.* 83: 807-812.
115. Berezney, R., Macaulay, L. K. and Crane, F. L. (1972). *J. Biol. Chem.* 247: 5549-5561.
116. Riemann, W., Muir, C. and MacGregor, A. C. (1969). *J. Cell. Sci.* 4: 299-304.
117. Goldstein, L. 1974. In: *The Cell Nucleus*. Busch, H., Ed. Academic Press. New York, and London.
118. Sbarsky, I. B., Delektorsky, V. V., Troitzkaya, L. P., Kuzmina, S. and Perevoshchikova, K. A. (1975). *Folia, Biol.* 21: 250-255.
119. Grinios, L. (1980). *Febs. Lett.* 113: 1-10.
120. Reynafarje, B. and Lehninger, A. L. (1969). *J. Biol. Chem.* 244: 584-593.
121. Widnell, C. C. and Tata, J. R. (1964). *Biochem. J.* 92: 313-317.
122. Hunter, G. R. and Brierley, G. P. (1969). *Biochim. Biophys. Acta.* 180: 68-80.
123. Reed, K. C. and Bygrave, F. L. (1974). *Biochem J.* 142: 555-566.
124. Scarpa, A., Brinley, F. J., Tiffert, T. and Dubyak, G. R. (1978). In: *Calcium Transport and Cell function*. Scarpa, A. and Carafoli, E., Eds. pag: 86-112. The New York Academy of Sciences. New York.
125. Cleland, K. W., and Slater, E. C. (1953). *Biochem. J.* 53: 547-556.
126. Schneider, W. C. (1957). *Meth. Enzymol.* Vol. 3: 680-684.
127. Cooperstein, J. J. and Lazarow, A. (1951). *J. Biol. Chem.* 189: 665-670.
128. Nordlie, R. C. and Aron, W. J. (1966). *Meth. Enzymol.* 9: 619-625.
129. Scatchard, G. (1949). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 51: 660-672.

130. White, B. A., Bauerle, L. R. and Bancroft, F. C.
(1981). J. Biol. Chem. 256: 5942-5945.
131. Wu, F. S., Park, Y. Ch., Roufa, D. and Martonosi, A.
(1981). J. Biol. Chem. 256: 5309-5315.
132. Schiaffonati, L., Cairo, G. and Bernelli-Zazzera, A.
(1978). J. Cell. Physiol. 97: 487-496.
133. Paine, P. L., Pearson, T. W., Tluczek, L. J. M. and
Horowitz, S. B. (1981). Nature. 291: 258-261.
134. Schibeci, A. and Martonosi, A. (1980). Eur. J.
Biochem. 113: 5-14.
135. Kane, A. B., Young, E. E., Schanne, F. A. X. and
Faber, J. L. (1980). Proc. Natl. Acad. Sci. USA.
77: 1177-1180.

FEBS LETTERS

A publication of the Federation of European Biochemical Societies

O. B. PTITSYN

Institute of Protein Research
Academy of Sciences of the USSR
142292 Pouchchino
Moscow Region
USSR

Dr. J. P. Pardo
Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma
de México
04510 México, D. F.

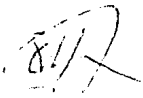
March 18, 1982.

Dear Doctor Pardo,

I have received your manuscript presented for publication in "FEBS Letters". I think that it is an interesting contribution and I should be glad to accept it. However, there is one point in the arrangement of your manuscript which is not normal for publications in "FEBS Letters". Usually the "Introduction" contains a short summary of the paper. In your case, for example, it would be desirable if you could already mention in the "Introduction" that the results of Ca-stimulating of RNA synthesis are not confirmed by your study which has shown instead that calcium inhibits RNA synthesis and that this effect (again unlike previous hypothesis) is not dependent on calmodulin. Incidentally, what does your notation uM mean (pages 2, 3 and 4)? μM ?

After you will make these revisions I shall be glad to accept your interesting article.

Sincerely yours,



O. B. Ptitsyn

1

EFFECT OF CALCIUM AND CALMODULIN ON THE RNA SYNTHESIS IN ISOLATED NUCLEI FROM RAT LIVER CELLS

J. P. Pardo and F. Fernández

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad
Nacional Autónoma de México, 04510 México, D. F.

1. Introduction

It is generally accepted that calcium regulates a great variety of intracellular processes (1-4). In some of them, such as muscular contraction (5) or the activation of adenylate cyclase (6, 7), calcium, acting as a coupling factor or second messenger (4), binds to specific proteins like troponin (5) or calmodulin (6-8) to exert its action.

But in some other processes, such as the RNA synthesis, the activation by calcium is not well understood. It has been reported that calcium stimulates RNA synthesis in slices of ventricular tissue (9), GH₃ cells (10) and cultures of chicken pectoralis muscle (11). But only indirect evidences are available about the molecular mechanism of such activation. The occurrence of calcium dependent protein kinases in the nuclei of rat liver cells (12), the participation of calcium on the phosphorylation of non-histone proteins (13, 14) and the presence of calmodulin in the nuclei of some cells (15), might suggest that calcium could stimulate RNA synthesis through interaction of calcium with calmodulin, activation of calcium dependent protein kinases by this calcium-calmodulin complex, phosphorylation of specific non-histone proteins and, finally, decompaction of the genome.

In order to test this hypothesis, we have investigated the effects of calcium, calmodulin and the calmodulin inhibitor, thapsigargin, on RNA synthesis in isolated nuclei from rat liver cells. The results on the stimulation of RNA synthesis by

71

calcium were not confirmed by our study, which has shown instead that calcium inhibits RNA synthesis and that this effect (again unlike previous hypothesis) is not dependent on calmodulin.

2. Material and Methods

2.1 Material: (2,6-³H)UTP was obtained from New England Nuclear. ATP, GTP, UTP, CTP, albumin, calmodulin and chlorpromazine were from Sigma. All other reagents were of analytical grade.

2.2 Isolation of nuclei: The livers were obtained from male Wistar albino rats, weighing 170-200 g. Nuclei were isolated by differential centrifugation according to Widnell and Tata (15).

2.3 Determination of the RNA synthesis: RNA synthesis was carried out following the method reported by Schiaffonati et al. (17). The assay was initiated with the addition of nuclei to the reaction mixture. The final mixture contained 35-45 μ g of nuclear protein, 17.5% glycerol, 150 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 25 mM Tris-HCl pH 8, 2.5 mM mercaptoethanol, 0.4 mM ATP, GTP, CTP and 0.05 mM (³H)UTP (0.65 Ci/nmol) in a volume of 0.1 ml. The mixture was incubated for 10 min at 37°C. The reaction was stopped by addition of 5 ml of 10% trichloroacetic acid/40 mM sodium pyrophosphate. The precipitated material was collected by filtration through Whatman GF/A papers, and washed with 50 ml of the same solution and 5 ml of ethanol. Radioactivity was determined in a liquid scintillation spectrophotometer.

2.4 Analytical methods: The concentration of proteins was determined by the method of Biuret (18).

3. Results

3.1 Effect of calcium and calmodulin on the RNA synthesis. In order to study the effect of calcium on the kinetics of RNA synthesis, the nuclei were incubated in the presence of 1.25 mM EGTA or 0.125 mM CaCl₂ for variable times. As shown in figure 1,

the initial rate of the RNA synthesis was lower in the presence of calcium than in the presence of EGTA. Incubation for times longer than 20 min were not studied because (^3H)UTP incorporation reaction is not involved in the initiation of RNA synthesis but only during chain elongation (17). Calcium also diminished the maximal incorporation of (^3H)UTP (see Fig 1 and Table I), suggesting a decrease in the total number of active initiation sites. Since calcium participates in a variety of processes through its complexing to calmodulin (1-3, 8), we also have studied the influence of this protein on the inhibition of RNA synthesis mediated by calcium. Two types of experiments were done. In one of them, calmodulin was present in the incubation mixture. In the other, we make use of chlorpromazine, an specific inhibitor of the calmodulin dependent processes (19). As shown in table I, the inhibition by calcium was not influenced by the presence of calmodulin or chlorpromazine. The concentration of calmodulin was varied from 0 to 10 μM without any detectable effect on the inhibition mediated by calcium (Fig 2).

3.1 Concentration dependence of the calcium mediated inhibition. RNA synthesis was studied incubating nuclei in the presence of different calcium concentrations. As shown in Figure 3, calcium inhibited the RNA synthesis in two ranges of concentration, the lower between 0-10 μM , and the higher over 0.5 mM.

4. Discussion

The role of calcium in processes such as muscular contraction, hormone secretion and neurotransmitter release is at present well documented (1-5, 8), whilst participation of this cation in the RNA synthesis remains obscure. In this work, we have demonstrated an inhibitory action of calcium on RNA synthesis. It should be pointed out that these results are in disagreement with some reports (6-11), in which the opposite effect has been described. In this work, we have used isolated nuclei, instead of slices (8) or cells cultures (10, 11). The differences in the experimental models could explain, in part, the disagreement of the results. The

activating action of calcium in slices or cell cultures could be a more complex phenomena than the simple interaction of the ion with some nuclear proteins, as had been proposed by Martonosi (11, 20).

The calcium concentration in the cytosol and probably in the nucleosol, is $1 \mu\text{M}$ or lower (21). As shown in figure 3, a first range of inhibition appear using calcium concentrations within the same order of magnitude. These data suggest that the inhibitory action of calcium on the RNA synthesis can be significant in vivo. Therefore its physiological significance remains to be studied.

Since calcium activates a variety of processes by complex formation with calmodulin (1-3, 8), we also have studied the influence of this protein and the specific inhibitor of calmodulin dependent processes, the antipsychotic drug chlorpromazine (19). The results obtained show that the effect of calcium was independent of calmodulin.

With respect to the inhibition of RNA synthesis produced by high calcium concentrations, it has been reported that hepatic damage produced by phalloidin is associated with an increase in the cytoplasmic concentration of calcium (22). Therefore, it is possible that inhibition of RNA synthesis at high calcium concentrations could be one of the events involved in the process of hepatic damage by toxic agents.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge Dr Juan Pedro Laclette, Dr Luis Cañedo, Dr Lourival Fossani, Dr Edmundo Chaves, for many invaluable discussions and critical reading of the manuscript.

Figure 1. Effect of calcium on the RNA synthesis.

Nuclei were incubated in presence of 1.25 mM EGTA (Δ) or 0.125 mM CaCl_2 (\bullet) for different times. The synthesis of RNA was assayed as described under Material and Methods. The zero time value obtained was subtracted from the other values. Results are the mean of three separate experiments.

Figure 2. Effect of calmodulin on the RNA synthesis.

Nuclei were incubated for 20 min in presence of 5 μM CaCl_2 and different concentrations of calmodulin. The synthesis of RNA was assayed as described. Results are the mean of two separate experiments.

Figure 3. Concentration dependence of calcium inhibition of RNA synthesis.

Nuclei were incubated for 20 min in presence of different concentrations of calcium. Synthesis of RNA was assayed as described. The maximum value of RNA synthesis was obtained incubating the nuclei in presence of 1.25 mM EGTA. Results are the mean of three separate experiments.

References.

1. Cheung, W. Y. (1980). *Science*. 207, 19-27.
2. Klee, C. B., Crouch, T. H. and Richman, P. G. (1980). *Ann. Rev. Biochem.* 49, 489-516.
3. Means, A. R. and Dadman, J. R. (1980). *Nature*. 285, 73-77.
4. Rasmussen, H. and Goodman, D. B. P. (1977). *Physiol. Rev.* 57, 421-489.
5. Ebashi, S. (1976). *Ann. Rev. Physiol.* 38, 293-314.
6. Brostrom, C. O., Hueng, Y. C., Breckenridge, B. M. and Wolff, D. J. (1975). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72, 64-66.
7. Cheung, W. Y., Emeckham, L. S., Lynch, T. J., Lin, Y. M. and Tallant, E. A. (1975). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 66, 1055-1062.
8. Scharff, O. (1981). *Cell Calcium*. 2, 1-27.
9. Kaplan, E. and Fichten, H. J. (1975). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 142, 487-489.
10. White, E. A., Isacenko, L. R. and Hancock, F. C. (1981). *J. Biol. Chem.* 256, 5942-5945.
11. Wu, F. S., Park, Y. Ch., Houfa, B. and Martonosi, A. (1981). *J. Biol. Chem.* 256, 1309-1315.
12. Schorrns, M., Markham, J. F., Walker, F. R. and Whitfield, J. F. (1980). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 93, 1191-1203.
13. Narungo, M. S. and Thakur, M. K. (1977). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 79, 1031-1034.
14. Narungo, M. S. and Thakur, M. K. (1979). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 86, 14-19.
15. Harper, J. F., Cheung, W. Y., Wallace, R. W., Huang, H. L., Levine, S. N. and Steiner, A. L. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77, 366-370.
16. Widnell, C. C. and Tata, J. R. (1964). *Biochem. J.* 92, 313-317.
17. Schiaffonati, L., Cairo, G. and Bernelli-Zanona, A. (1978). *J. Cell. Physiol.* 97, 487-495.
18. Cornall, A. G., Bardawill, C. J. and David, M. M. (1949). *J. Biol. Chem.* 177, 751-774.
19. Levine, R. M. and Weiss, B. (1976). *Mol. Pharmacol.* 12, 581-589.
20. Schlicht, A. and Martonosi, A. (1960). *Eur. J. Biochem.* 113, 5-14.
21. Murphy, E., Cell, M., Fisch, T. L. and Williamson, J. R. (1980). *J. Biol. Chem.* 255, 6500-6506.
22. Fane, A. B., Young, E. E., Schanne, F. A. X. and Faber, J. L. (1960). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77, 1177-1180.

Table I. The effect of calcium ions and calmodulin on RNA synthesis in isolated nuclei from rat liver cells.

Incubation conditions	RNA synthesis % activity
1. EGTA	100
2. Ca^{2+}	62.9
3. Ca^{2+} plus calmodulin	61.2
4. Ca^{2+} plus calmodulin plus chlorpromazine	63.1

Nuclei were incubated for 20 min in presence of: 1.- 1.25 mM EGTA, 2.- 0.125 mM CaCl_2 , 3.- 0.125 mM CaCl_2 plus 1 μM calmodulin, 4.- 0.125 mM CaCl_2 plus 1 μM calmodulin plus 0.25 mM chlorpromazine. The synthesis of RNA was assayed as described under Material and Methods. The results are the mean of three separate experiments.

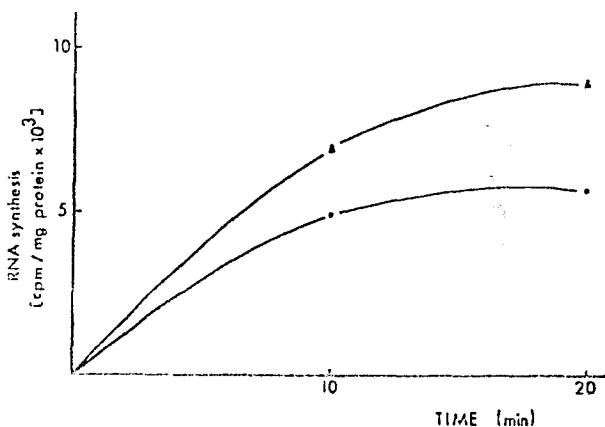


Figure 1

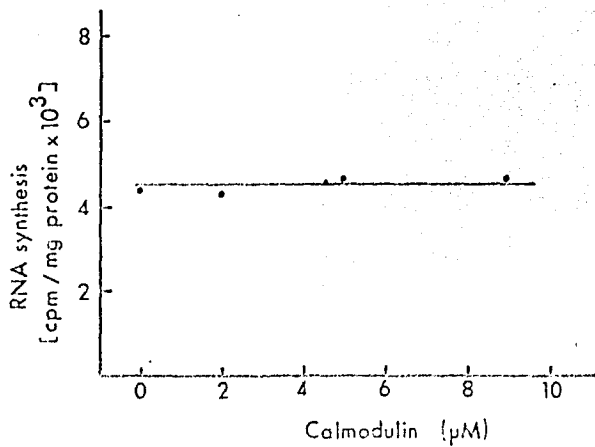


Figure 2

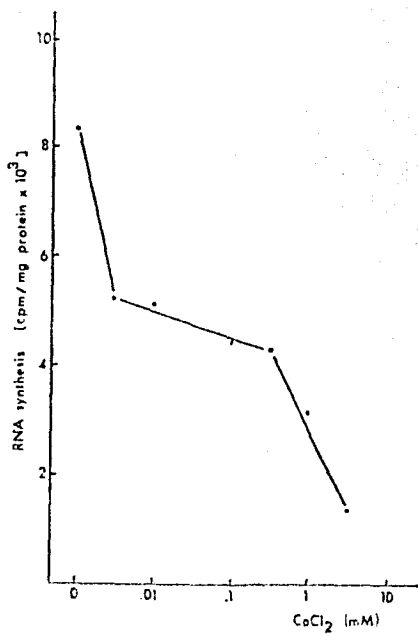


Figure 3