

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
PROGRAMA PARA EL DESARROLLO DE LAS CIENCIAS BÁSICAS
(PEDECIBA)

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS

DNasa I EN EL CRISTALINO BOVINO

Alicia De María Leiva

Laboratorio de Cultivo de Tejidos
Biología Celular
Facultad de Ciencias

2002

Orientador:
Prof. Dra. Cristina Arruti

Tribunal:
Presidente: Prof. Dra. Elia Nunes
Vocales: Prof. Dr. Ricardo Ehrlich
Dr. Gustavo Folle

Me resulta imposible encontrar las palabras para expresar mi agradecimiento a personas que me son muy queridas, por eso a ellos les dedico este trabajo de Tesis.

A mis padres, por su apoyo incondicional desde el día que decidí abrazar esta carrera.

A Cristina, por abrirme las puertas de su Laboratorio, por dedicar su tiempo a enseñarme el mundo fascinante de la Biología Celular y por darme el coraje para seguir en la aventura

AGRADECIMIENTOS

Ante todo deseo expresar mi agradecimiento al PEDECIBA y a todos sus integrantes, por permitir la realización de este trabajo de Tesis.

Este trabajo de Tesis no habría sido posible sin la ayuda de muchas personas a las que quiero expresar mi más profundo agradecimiento.

A los Dres. Pereira, Islas y Cuevas del Frigorífico Matadero Carrasco por proveer el material biológico.

Al Dr. Enrique Lessa por sus consejos y por haberme brindado la oportunidad de realizar experimentos en su laboratorio.

Al Mag. Carlos Sanguinetti y los integrantes del Laboratorio 314 de la Sección Bioquímica por su apoyo constante.

Al Dr. Battistoni, de la Cátedra de Inmunología de la Facultad de Química, por todo el apoyo brindado en la preparación de los anticuerpos.

A la Dra. Angela Suburo de la Universidad Austral de Argentina, por la posibilidad de utilizar el microscopio confocal, de crucial importancia en este trabajo.

A los Dres. Marie-France Counis e Yves Courtois, U450 INSERM, Développement, vieillissement et pathologie de la rétine, con quienes tuve la oportunidad de trabajar durante unos meses.

A los Dres. Ricardo Benavente y Rafael Radi por su generosidad al haberme cedido el anticuerpo anti-laminas y la sonda rodamina 123.

A los miembros del tribunal: Prof. Dra. Elia Nunes, Prof. Dr. Ricardo Ehrlich y Dr. Gustavo Folle por hacerme el honor de juzgar este trabajo.

A mis compañeros de Biología Celular y a la Sra. Libertad Lamarque de Nusa, Doña Nusa, por su apoyo constante.

A Flavio por compartir “las cosas buenas” y “las no tan buenas” en el día a día del laboratorio.

INDICE

I. INTRODUCCIÓN	
1. DNasaI.....	1
1.1. Localización subcelular	1
1.2. Glicosilación	2
1.2.1. Fosforilación de residuos manosa	3
1.3. Isoformas presentes en el páncreas bovino	3
1.4. Características de la estructura primaria	4
1.5. Estructura tridimensional	5
1.6. Actividad de la DNasa I	7
1.6.1. Iones metálicos como activadores de la DNasa I ..	7
1.6.1.1. Otros roles del ion calcio	7
1.6.2. Especificidad y eficiencia de la actividad	7
1.6.3. Interacción con el ADN	8
1.6.4. Mecanismo de acción	9
1.7. Inhibidores	9
1.8. DNasa I en los Vertebrados	11
1.8.1. DNasa I en anfibios, características especiales .	13
1.9. Distribución tisular	14
1.10. Estructura génica	14
1.10.1. Organización del gen murino	14
1.10.2. Estructura génica en la rata	15
1.10.3. Estructura del gen humano	15
1.10.3.1. Polimorfismo en humanos	16
1.11. Otros miembros de la familia DNasa I	16
1.11.1. DNasas 1 L2 y L3	16
1.11.2. DNasa L1	17
1.12. DNasa I y lupus: efectos de la delección del gen de la DNasa I ..	17
2. Diferenciación del núcleo y otros organelos en las células fibra en el cristalino de los Vertebrados	19
2.1. Diferenciación de células fibra	20
2.2. Generación de la zona libre de organelos	21
2.2.1. Posibles eventos desencadenantes de la degradación de organelos	21
2.3. Procesos de degradación de organelos	22
2.3.1. Mitocondrias	22
2.3.2. Retículo endoplásmico	23
2.3.3. Aparato de Golgi	23
2.3.4. Núcleo	23
2.3.4.1. Degradación en las fibras primarias	23
2.3.4.2. Degradación en las fibras secundarias ..	23
2.4. Nucleasas cristalineanas	24
2.4.1. Nucleasas calcio, magnesio-dependientes tipo DNasa I	24
2.4.2. Nucleasas ácidas, catión-independientes tipo DNasa II	24
2.4.3. Nucleasas dependientes de un único catión	25
3. Degradación nuclear en la apoptosis	26
3.1. Eventos nucleares	26
3.1.1. Activación de agentes inductores de la compactación de la cromatina	26
3.1.2. Degradación de componentes de la matriz nuclear ..	27
3.1.3. Degradación de la lámina nuclear	27
3.1.4. Activación de CAD	27
3.2. Fragmentación de la cromatina	27
3.3. Nucleasas apoptóticas	29
3.3.1. DNasa II	29
3.3.2. Nucleasa dependiente de caspasas (CAD)	29

3.3.3. DNasa gama	30
3.3.4. DNasa I	30
II. RESULTADOS	
1. Existencia de ARN mensajeros de DNasa I en el cristalino ...	32
2. Secuenciación y análisis del gen de la DNasa I bovina	37
3. Determinación de la presencia de DNasa I en el cristalino bovino	45
4. Localización de la DNasa I en células del cristalino	50
5. DNasa I en células epiteliales del cristalino bovino <i>in vitro</i>	58
6. Liberación de DNasa I al medio extracelular	67
7. Glicosilación de la DNasa I sintetizada por células BEL	70
8. Cambios en la distribución de DNasa I durante la degradación nuclear apoptótica inducida por estaurosporina en células BEL	72
III. DISCUSIÓN	79
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	96
V. BIBLIOGRAFÍA	105

I. INTRODUCCION

La DNasa I secretada por las células acinares del páncreas y la glándula parótida hacia el tracto digestivo, tiene como función la hidrólisis del ADN exógeno durante la digestión. Sin embargo, la demostración de la presencia de actividades DNasa I fuera de órganos exócrinos digestivos (Lacks, 1981) planteó nuevas preguntas sobre sus posibles roles funcionales. En los últimos años se han encontrado importantes evidencias que la involucran en otras funciones vinculadas con la homeostasis tisular y la degradación nuclear en la apoptosis y algunas vías de diferenciación celular terminal. En esta primera parte de la Introducción presentamos una revisión bibliográfica de las características de esta enzima.

1. DNasa I

La desoxiribonucleasa I (DNasa I; EC 3.1.21.1), nucleasa que hidroliza el ADN liberando extremos 3'OH, fue inicialmente conocida por su rol en procesos digestivos. Es secretada al tracto digestivo por el páncreas (Kraehenbuhl et al. 1977), por glándulas salivares (Lacks, 1981), células epiteliales del intestino (Yasuda et al., 2001) y del estómago (Shimada et al., 1998).

La DNasa I pancreática bovina (Swiss Prot P00639) ocupa un lugar preponderante en la historia de la enzimología, ya que fue la primera DNasa en ser descubierta, la primera en ser cristalizada y la primera para la cual se identificó un inhibidor proteico. Es la mejor conocida de todas las DNasas I estudiadas. Fue purificada y cristalizada inicialmente por Kunitz en 1948 (Kunitz, 1948) en continuación de los trabajos iniciales de Mc Carty (Mc Carty, 1946). Kunitz realizó una descripción detallada de las características generales de la enzima incluyendo análisis cinéticos (Kunitz, 1950 a y b). Su composición aminoacídica y peso molecular fueron determinados por Lindberg en 1967. El valor obtenido por cálculo a partir de la secuencia aminoacídica fue de 30.664 +/- 322 daltons; por sedimentación Lindberg obtuvo un único pico simétrico a 2.84 S y por ultracentrifugación, con la técnica de aproximación al equilibrio, determinó un peso molecular de 31 Kda. (Lindberg, 1967). Kunitz determinó el peso molecular de la DNasa I mediante medidas de difusión y Smith a partir de cálculos de volumen obtenidos en experimentos de bombardeo electrónico (Kunitz, 1950a; Smith, 1953). Ambos autores basaron sus cálculos en valores de densidad de 1.3 llegando a determinar un peso molecular de aproximadamente 60 Kda, por lo que presumiblemente se trataba de dímeros.

1.1. Localización subcelular

Intracelularmente la DNasa I se localiza en gránulos de zimógeno y está presente en organelos involucrados en la vía de secreción extracelular como el retículo endoplásmico rugoso y el aparato de Golgi (Kraehnbulh et al., 1977). A diferencia de otras proteínas de secreción pancreática, no presenta un gradiente

de concentración creciente desde el retículo endoplásmico a los gránulos de zimógeno (Bendayan et al., 1980). La distribución en la vía de secreción de proteínas no solamente se encuentra en las células acinares del páncreas, sino también en las células de Paneth del intestino delgado (Shimada et al., 1998) y en las células secretoras de hormonas de los lóbulos anterior e intermedio de la glándula pituitaria de ratas y humanos (Shimada et al., 1998b). La DNasa I también ha sido encontrada en el espacio perinuclear en timocitos (Peitsch et al., 1993) y fibroblastos (Peitsch et al., 1994).

1.2. Glicosilación

La glicosilación juega un rol crítico en la síntesis, estabilidad y rol biológico de la mayoría de las proteínas secretadas (Varki, 1993). La glicosilación en residuos asparagina ocurre en el retículo endoplásmico rugoso. Allí, una oligosacárido transferasa transfiere un oligosacárido rico en manosa desde un precursor lipídico (dolicol) a un residuo asparagina específico (Kornfeld et al., 1985; Silberstein y Gilmore, 1996). Las secuencias consenso para esta transferencia son dos, Asn-Xaa-Ser/Thr, utilizada en la amplísima mayoría de los casos y Asn-Xaa-Cys (Hart et al., 1979; Bause y Legler, 1981; Kaplan et al., 1987). La existencia de uno de estos tripéptidos no es suficiente para que ocurra glicosilación, esto depende, entre otras cosas, de la proteína en particular. En efecto, se ha sugerido que las cadenas de oligosacáridos se sitúan en la cercanía de regiones en las que el esqueleto proteico tiene lazos, ya que la exposición del triplete señal es necesaria para que sea reconocido por la glicosil transferasa (Beeley, 1977; Aubert et al., 1976; Pless, 1977).

La eficiencia de glicosilación de cada sitio particular depende en gran medida de los aminoácidos que ocupen la segunda y tercera posición. Cuando el aminoácido que ocupa la segunda posición es una prolina, la glicosilación es nula. Cuando se trata de triptofano, ácido aspártico, ácido glutámico y leucina, la eficiencia es muy baja, mientras que para el resto de los aminoácidos, la eficiencia es buena (Shakin-Eshelman et al., 1996). El aminoácido en la tercera posición tiene un rol catalítico directo en la transferencia de los oligosacáridos; por ejemplo: se ha observado que en presencia de una treonina, la eficiencia de glicosilación aumenta hasta tres veces en comparación con una serina (Kasturi et al., 1995).

La DNasa I es una glicoproteína en la que se encuentran residuos glucosamina y manosa (Price et al., 1969a; Catley et al., 1969). En bovinos, esta proteína posee dos sitios posibles de glicosilación: Asn¹⁸-Ala-Thr y Asn¹⁰⁶-Asp-Ser (Salnikow et al., 1973; Liao et al., 1973). La isoforma A, componente mayoritario purificado a partir de páncreas bovino, posee una sola cadena de carbohidratos asociada a la asparagina presente en la posición 18 de la proteína madura. Promedialmente, la cadena de carbohidratos es un heptasacárido compuesto por 2 N-acetilglucosaminas y 5 residuos manosa (Price et al., 1969a). En el caso de la enzima pancreática de cerdo, ambos sitios de glicosilación están ocupados (Paudel y Liao, 1986). En los bovinos, la enzima presente en la parótida tiene un peso molecular relativo 3000 daltons mayor que la enzima pancreática (Lundblad et al., 1977). Algunos estudios, realizados con ambas

enzimas puras muestran que la enzima pancreática tiene una sola cadena de carbohidratos asociada mientras que la enzima de la glándula parótida posee dos cadenas (Abe y Liao, 1983).

Las células COS-1, transfectadas con un vector de expresión para la DNasa I bovina, sintetizan esta enzima con un 100% de glicosilación en la asparagina 18 y un 70% en la asparagina 106. En el caso del páncreas y del riñón, la enzima solo presenta una cadena de carbohidratos unida a la asparagina 18, mientras que en bazo, pulmones y glándulas submaxilares, la asparagina 106 también está ocupada, aunque no en el 100% de las moléculas (Nishikawa y Mizuno, 2001). El análisis del estado de glicosilación de la DNasa I producida por los distintos tipos de tejidos *in vivo*, sugiere que existen diferencias en la capacidad de los distintos tipos celulares de utilizar las señales de glicosilación

que presentan aminoácidos subóptimos en la segunda y tercera posición (Nishikawa y Mizuno, 2001), sin descartar la posibilidad de que se deba a diferencias en la disponibilidad de precursores glucolipídicos (Carson et al., 1981).

1.2.1. Fosforilación de residuos manosa

La separación de las hidrolasas lisosomales del resto de las proteínas de secreción en el aparato de Golgi y el envío de las primeras al lisosoma, depende del reconocimiento específico de manosas fosforiladas (von Figura y Hasilik, 1986). Esta especificidad yace en la enzima N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa. Esta enzima reconoce una señal conformacional presente en las hidrolasas, catalizando la transferencia de residuos N-acetilglucosamina fosforilados a los residuos manosa. Posteriormente la N-acetilglucosamina es eliminada por la enzima N-acetilglucosamina-1-fosfodiesterasa, dejando residuos manosa-6-fosfato.

Existen unas pocas proteínas no-lisosomales que pueden ser sustrato de estas enzimas, entre ellas la DNasa I (Nishikawa et al., 1997). La expresión de DNasa I bovina en células COS-1 mostró que la proteína tenía un bajo nivel de fosforilación en sus residuos manosa. También fue posible determinar que las lisinas 50 y 124 y la arginina 27 son los aminoácidos responsables del reconocimiento por la fosfotransferasa. El bajo nivel de fosforilación resultante podría deberse a la presencia de la arginina en la posición 27 y no de una lisina, ya que un intercambio entre estos aminoácidos determina un aumento de más del 50% en el nivel de fosforilación (Nishikawa et al., 1997; Nishikawa et al., 1999). Algunos ensayos de unión de DNasa I al receptor de manosa-6-fosfato independiente de cationes, mostraron que la enzima pancreática de origen bovino, no posee residuos manosa fosforilados, pero que la DNasa I presente en la orina humana, o expresada en células COS-1, los tienen y están en ambas cadenas de carbohidratos (Cacia et al., 1998). Es probable que la susceptibilidad a la fosforilación dependa del tipo celular en el que se exprese la enzima.

1.3. Isoformas presentes en el páncreas bovino

A partir de páncreas bovino se obtienen 4 fracciones con actividad DNasa I luego de una cromatografía en columna de fosfocelulosa. El

componente principal es denominado DNasa I A y los restantes DNasas I B, C y D. En el propio páncreas las primeras tres isoformas se encuentran en la siguiente proporción: 4:1:1, la forma D está presente pero en bajísima concentración. Estas proporciones cambian sutilmente cuando se analizan las isoformas presentes en el jugo pancreático, la isoforma B pasa a ser más abundante que la C (Salnikow et al., 1970). Del análisis de mapas peptídicos de las isoformas A y C se extrae que la única diferencia entre ellas es un aminoácido. La DNasa I C tiene un residuo prolina en la posición 143 de la enzima precursora, en vez de la histidina presente en la isoforma A, cambio que explicaría la diferencia de punto isoeléctrico entre ambas isoformas (Salnikow y Murphy, 1973).

Las isoformas A y B no se distinguen a nivel aminoacídico, su diferencia se debe a la porción carbohidrato. En la isoforma A, los azúcares encontrados son dos residuos de N-acetilglucosamina y 5 residuos manosa, los mismos que fueron encontrados en la isoforma B, solo que en esta última también se encontró un residuo de ácido siálico. Esto explicaría el menor punto isoeléctrico de la isoforma B (Catley et al., 1969; Salnikow et al., 1970). Finalmente, las isoformas C y D son indistinguibles en su composición aminoacídica, siendo la única diferencia entre ellas la presencia de un residuo galactosa y uno de ácido siálico en la isoforma D (Liao, 1974).

1.4. Características de la estructura primaria

La proteína predominante es la isoforma A, su secuencia aminoacídica fue determinada por Liao y colaboradores en 1973 (Liao et al., 1973) y se muestra en la Figura 1.

```

1  MRGTRLMGLL LALAGLLQLG LSLKIAAFNI RTFGETKMSN 40
41 ATLASIVIRI VRRYDIVLIQ EVRDSHLVAV GKLLDYLNQD 80
81 DPNTYHYVVS EPLGRNSYKE RYLFLFRPNK VSVLDTYQYD 120
121 DGCESCGND SFSREPAVVKF SSHSTKVKEF AIVALHSAPS 160
161 DAVAEINSLY DVYLDVQQKW HLNDVMLMGD FNADCSYVTS 200
201 SQWSSIRLRT SSTFQWLIPD SADTTATSTN CAYDRIVVAG 240
241 SLLQSSVVP GSAAPFDFQAA YGLSNEMALA ISDHYPVEVT 280
281 LT

```

Figura 1. Secuencia aminoacídica de la DNasa I pancreática bovina. En rojo se señalan los aminoácidos correspondientes al péptido señal, en azul las asparaginas de unión a carbohidratos, en amarillo tres de los aminoácidos clave del sitio activo y en verde las cisteínas que forman los puentes disulfuro.

La DNasa I pancreática bovina es sintetizada como una cadena polipeptídica de 282 aminoácidos, los primeros 22 corresponden al péptido señal. En su secuencia hay cuatro cisteínas ubicadas en las posiciones 123, 126, 195 y 231. Cuando la DNasa I es reducida con β -mercaptoetanol en presencia de calcio, uno de los puentes disulfuro se reduce sin que ocurra pérdida de actividad catalítica, pero cuando la reducción ocurre en ausencia de calcio ambos puentes se rompen y la actividad se pierde (Price et al., 1969). Posteriormente Liao y colaboradores mostraron que el puente disulfuro esencial

es el que se encuentra entre las cisteínas 195 y 231, que determina la formación de un pequeño lazo en la molécula (Liao et al., 1973).

El conocimiento de la secuencia primaria permitió el análisis de aminoácidos individuales y su rol en la función de la enzima. Se determinó que la tirosina presente en la posición 87, que forma parte de un sitio de unión al calcio, es fundamental para la actividad de la misma (Hugli y Stein, 1971). Otros aminoácidos presentes en el sitio activo y fundamentales para la actividad son un ácido glutámico en la posición 100 y una histidina en la posición 156 (Price et al., 1969). También se conoce que los aminoácidos glutamina y valina presentes en las posiciones 35 y 89 respectivamente, están implicados en la interacción con la actina.

1.5. Estructura tridimensional

La estructura tridimensional de la DNasa I fue resuelta por cristalografía de rayos X, a una resolución de 2.5 Å, por Suck, Oefner y Kabsch en 1984. En la Figura 2 se muestra una representación esquemática de la DNasa I pancreática bovina (Suck et al., 1984). La DNasa I es una proteína compacta cuyas dimensiones aproximadas son 45x40x35 Å con una cadena de carbohidratos, que sobresale 15 Å desde la superficie, al comienzo de la hélice 1, como se muestra en la Figura 3.

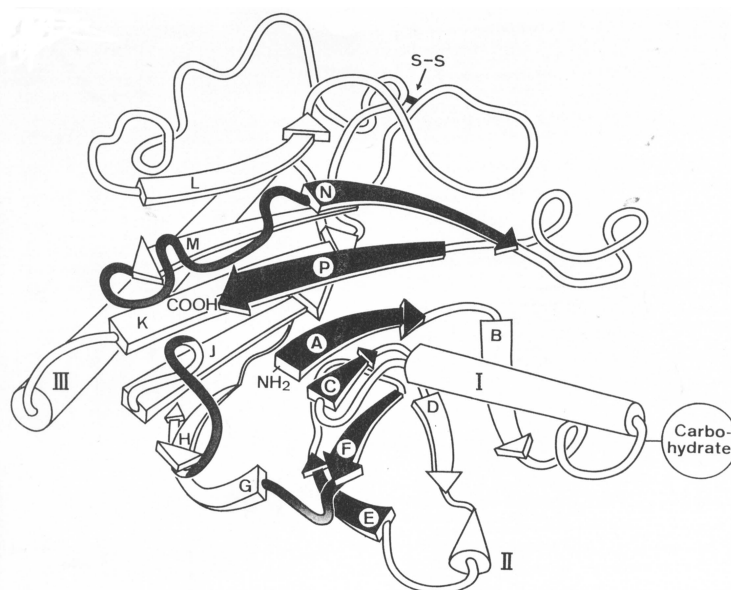


Figura 2. Representación esquemática de la estructura tridimensional de la DNasa I bovina. Las hojas en β están representadas por flechas y las hélices α por cilindros. La cadena de carbohidratos está asociada a Asn 18, al inicio de la hélice 1. S-S representa el puente disulfuro entre las Cys 170 y 206. Extraída de: Suck, Oefner y Kabsch, 1984.

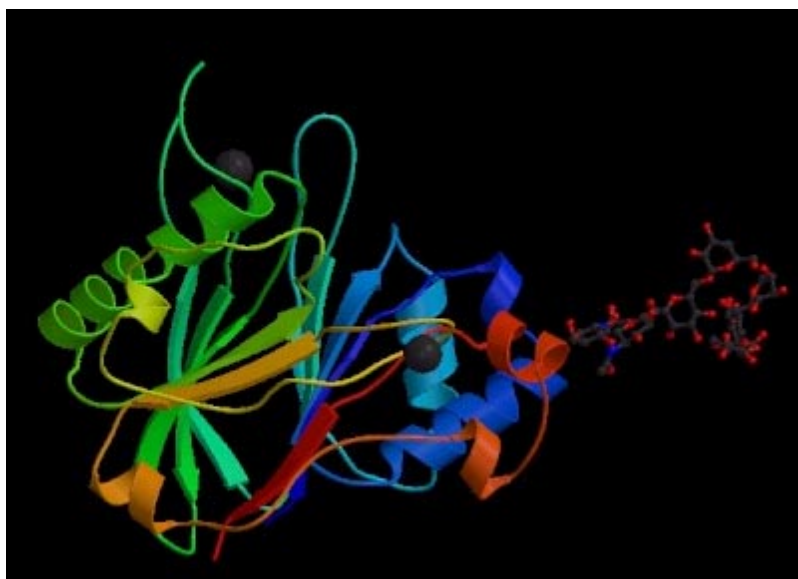


Figura 3. Representación esquemática de la DNasa I bovina. Extraída del servidor *Expasy*. Dirección: <http://ca.expasy.org/cgi-bin/get-sw3d-entry?P00639>.

La DNasa I es una proteína de tipo alfa-beta con dos hojas beta, de seis láminas en antiparalelo cada una, apretadas una contra otra formando un centro compacto. Las hojas beta están flanqueadas por lazos y alfa-hélices. El 34% de los aminoácidos están ubicados en las hojas en beta y un 23 % en las hélices.

La DNasa I tiene dos sitios de unión al calcio a pH 7.5 (sitios I y II), que tienen una K_D de 1.4×10^{-5} M (Price, 1972). Los mapas de densidad electrónica de cristales formados en presencia de 5×10^{-5} M de Ca^{++} a pH 6.6, indican la presencia de por lo menos dos átomos de calcio unidos a la proteína. En el sitio I, el ión calcio es coordinado por oxígenos de los siguientes aminoácidos: Asp 201 y las Thr 203, 205 y 207. En el caso del sitio II, los aminoácidos involucrados son: Asp 99 y 107, Phe 109 y Glu 112 (Chen et al., 2002) (Figura 4).

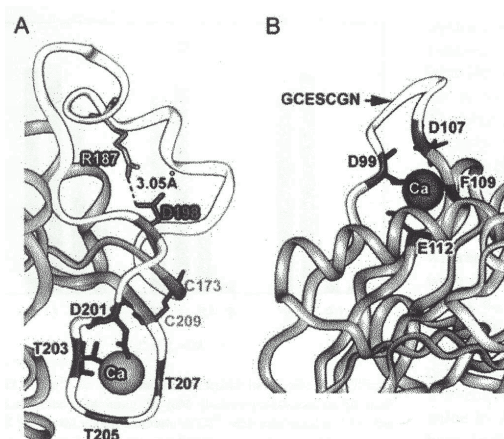


Figura 4. Representación esquemática de los sitios de unión al calcio de la DNasa I bovina. A. sitio I, B. sitio II. Extraído de Chen, Lu y Liao, 2002.

La DNasa I puede separarse en dos fragmentos, del aminoácido 1 al 120 y del 121 al 260, que pueden superponerse muy bien, desde el punto de vista topológico pero no de su secuencia. La primera mitad contiene no solo el lazo de unión al ADN formado desde la arginina 70 a la lisina 74, sino además otra serie de aminoácidos de carga positiva que interactúan con fosfatos de ambas hebras de la doble cadena. Es por eso que se ha sugerido que la DNasa I haya surgido por duplicación génica. La mitad ancestral, que sería la correspondiente a los aminoácidos 1 a 120, habría tenido la propiedad de cortar el ADN específicamente en ambas hebras, al fusionarse con la segunda mitad habría adquirido la actividad endonucleasa típica de la DNasa I (Oefner y Suck, 1986).

1.6. Actividad de la DNasa I

1.6.1. Iones metálicos como activadores de la DNasa I

La DNasa I es activada por cationes bivalentes metálicos, entre ellos calcio, magnesio y manganeso (Shack y Bynum, 1964; Poulos y Price, 1972; Junowicz y Spencer, 1973 a y b). Se observa un aumento en el requerimiento de magnesio o manganeso, al ser utilizados de manera aislada, al aumentar la concentración de ADN hasta valores de saturación (2mg/ml). Este aumento es dependiente del pH, ya que no se observa a valores de pH menores o mayores a 5.5 y 6.5 respectivamente. Esto estaría indicando que la DNasa I se une a un complejo formado por el ADN y los iones metálicos (Shack y Bynum, 1964). El tipo de corte en el ADN de doble cadena también depende de la naturaleza del metal activador: en presencia de calcio y magnesio realiza cortes de cadena simple, mientras que en presencia de manganeso realiza cortes de doble cadena (Bernardi y Sandron, 1964; Young y Sinsheimer, 1965; Melgar y Goldthwait, 1968; Campbell, 1980).

1.6.1.1. Otros roles del calcio

Dos iones de calcio se unen fuertemente a la DNasa I a pH 7.5. Esta unión tiene profundos efectos sobre la estructura de la enzima, constatables por cambios de absorbancia de luz ultravioleta y en el dicroísmo circular de la misma (Poulos y Price, 1972; Tullis y Price, 1974). El calcio es fundamental para la protección del puente disulfuro, esencial para la actividad enzimática, frente a agentes reductores como el β -mercaptoetanol (Price et al., 1969). Otro de sus roles es permitir la unión al sustrato (Price, 1975), así como revertir cambios conformacionales inducidos por pH alcalino (Lizarraga et al., 1978).

Finalmente, pero no menos importante, es que la presencia de 5mM de calcio estabiliza a la enzima contra el ataque proteolítico de enzimas como la tripsina y la quimiotripsina (Price, 1969). Esta propiedad es fundamental, ya que permitiría que la DNasa I permanezca activa en presencia de proteasas comunes en la secreción exócrina del páncreas.

1.6.2. Especificidad y eficiencia de la actividad.

Si bien la DNasa I no tiene especificidad de secuencia para realizar los cortes no lo hace al azar, ya que corta preferencialmente en el lado 5' de bases pirimidínicas (Bernardi et al., 1975). La DNasa I reconoce sutiles diferencias en la química y geometría de nucleótidos individuales, características que los

hacen diferencialmente resistentes a la acción de la misma (Clark y Eichhorn, 1974).

En presencia de iones magnesio, la DNasa I realiza los cortes adyacentes a bases timidina con mayor frecuencia. En cambio, la presencia de iones cobre o mercurio vuelve a las timidinas y guaninas, respectivamente, más resistentes al ataque de la nucleasa. En resumen, el tipo de ión metálico asociado al sustrato puede cambiar selectivamente la susceptibilidad del enlace fosfodiéster a ser cortado por la DNasa I (Clark y Eichhorn, 1974).

La DNasa I es una nucleasa no-específica que actúa a nivel del surco menor, clivando enlaces fosfodiéster en una hebra por vez. Se ha sugerido que la eficiencia catalítica de la DNasa I es sensible al ancho del surco menor del ADN blanco, la eficiencia es mayor cuando el ancho del surco menor ronda un valor intermedio de 12 Å (Drew y Travers, 1984).

1.6.3. Interacción con el ADN

Existe un modelo de interacción entre la DNasa I y la molécula de ADN, propuesto por Suck y colaboradores (1988). La hebra de ADN que va a ser cortada estaría unida a la superficie levemente cóncava de la proteína, ubicada entre dos hojas en beta cerca de la histidina 156 (Figura 5). El enlace fosfodiéster se anclaría a la enzima a través del ion calcio. Dos fosfatos cercanos en dirección 5', harían contacto con los aminoácidos arginina 70 y 108, mientras que el siguiente fosfato en dirección 3', interactuaría con el aminoácido arginina 9. Dos fosfatos de la otra hebra, expuestos en el surco menor, se pegarían a los aminoácidos lisina 74 y arginina 38 (Suck y Oefner, 1986).

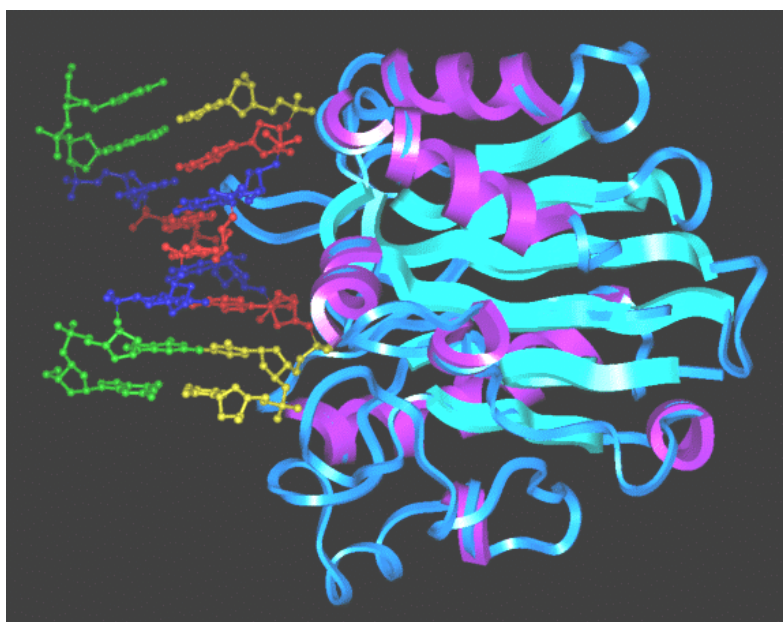


Figura 5. Representación esquemática de la estructura tridimensional del complejo DNasa I:ADN. Las α -hélices se muestran en violeta, las hojas en β en cian y el resto del polipéptido en celeste. En el ADN las adeninas se muestran en rojo, las timidinas en azul, las guaninas en verde y las citosinas en amarillo. Extraído del servidor de la Universidad Estatal de New Jersey.

Dirección: <http://ndbserver.rutgers.edu/NDB/NDBATLAS/P/pde005/pde005.html>.

1.6.4. Mecanismo de acción

La DNasa I puede actuar sobre ADN de cadena simple (Young y Sinsheimer, 1965), doble o sobre cromatina, en este último caso sobre regiones del ADN libres de histonas (Billing y Bonner, 1972). Las histonas restringen la acción de la nucleasa en intervalos de tiempo cortos, pero a intervalos de tiempo mayores todo el ADN es susceptible de ser degradado. Esto resultaría por un debilitamiento de la unión entre las histonas y el ADN. No todas las histonas son igualmente efectivas en el bloqueo de la acción de la DNasa I, las histonas ricas en lisina son más efectivas en el bloqueo de la acción de la DNasa I que las histonas ricas en arginina (Mirsky y Silverman, 1972 a y b).

Los patrones de digestión de ADN en núcleos completos no dependen de las condiciones de digestión, sino que reflejan la accesibilidad de la DNasa I al ADN espaciador y al ADN nucleosómico del cual siempre corta la hebra expuesta. A su vez, cuando el ADN espaciador está expuesto, éste es el primero en ser cortado (Staynov et al., 2000).

La DNasa I corta enlaces fosfodiéster, preferencialmente adyacentes a una base pirimidina, dejando polinucleótidos con extremos 5'fosfato y 3' OH. Suck y Oefner (1986) propusieron un mecanismo de acción de la DNasa I basándose en los siguientes puntos: la geometría del sitio activo de la enzima, las posiciones de los átomos de calcio y la ubicación de una de las moléculas de agua (a la que los autores denominaron 390). Esta molécula formaría un puente de hidrógeno con el N3 de la histidina 131. El anión carboxilato del ácido glutámico 75 aceptaría un protón de la histidina 131, quién a su vez recibiría uno de la molécula de agua 390, la que como grupo nucleofílico atacaría al fósforo, clivando el puente 3'-P-O. El calcio posicionaría correctamente el enlace fosfodiéster con respecto a la enzima, así como también facilitaría el ataque nucleofílico del grupo hidroxilo del agua a través de su carga positiva (Suck y Oefner, 1986).

La DNasa I cliva la molécula de ADN cerca del extremo 3', o del centro de la misma, pero nunca o a muy baja frecuencia, en el extremo 5' (Lomonosoff et al., 1981; Drew, 1984). El largo mínimo de un polinucleótido blanco es de 4 pares de bases (Matsuda y Ogoshi, 1966), siendo el óptimo alrededor de 6 pares de bases (Suck et al., 1988). El modelo propuesto por Suck y Oefner ofrece una explicación para este comportamiento: la correcta ubicación, así como la unión del ADN a la enzima, sólo son posibles con un surco menor completo, que permita interacciones con fosfatos de ambas hebras del ADN.

1.7. Inhibidores

La actividad de la DNasa I puede ser inhibida por una serie de inhibidores generales de nucleasas. Entre ellos se encuentran el ácido aurintricarboxílico (ATA), el ión zinc y agentes quelantes para cationes divalentes como el EDTA (Junowicz y Spencer, 1973; Funakoshi et al., 1977; Lizarraga et al., 1978). Sin embargo, en los años 50 se describió en tejidos tan diversos como testículos, hígado, cerebro y pulmones, la presencia de inhibidores proteicos específicos de la DNasa I cuyo peso molecular rondaba los 45 Kda (Cooper et al., 1950; Festy y Paoletti, 1963; Berger y May, 1964).

Lazarides y Lindberg (1974) mostraron que ese inhibidor proteico, tan ampliamente distribuido entre distintos tipos celulares, era la actina G. Encontraron que no había diferencia en el peso molecular, composición aminoacídica y mapas peptídicos entre el inhibidor purificado a partir de bazo y la actina. También determinaron que la actina muscular esquelética era capaz de inhibir la actividad de la DNasa I (Lazarides y Lindberg, 1974).

La DNasa I es capaz de causar la depolimerización de la actina F a través de un corrimiento en el equilibrio de las formas G y F. Ambas proteínas forman un complejo estequiométrico 1:1 (Figura 6), con una constante de afinidad de 5×10^{-8} M (Mannherz et al., 1975; Hitchcock et al., 1976). Es más, la DNasa I enlentece el intercambio del nucleótido unido a la actina por ATP cuando es agregada a actina G o F (Hitchcock, 1980). El complejo formado entre la DNasa I y la actina G ha sido cristalizado y su estructura resuelta a 2.8 Å (Kabsch et al. 1990).



Figura 6. Representación esquemática de la estructura tridimensional del complejo actina:DNasa I. A a la izquierda la actina y a la derecha la DNasa I. Extraído del servidor *Expasy*.

Dirección: <http://ca.expasy.org/cgi-bin/get-sw3d-entry?P00639>.

Los contactos más importantes entre ambas proteínas ocurren mediante puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas e hidrofóbicas entre los aminoácidos glicina 42, valina 43 y metionina 44 de la actina y la tirosina 65, el ácido glutámico 35 y las valinas 66 y 67 de la DNasa I. La unión entre la actina y

la DNasa I es muy fuerte, causando una distorsión en la estructura nativa de la nucleasa, en la que ocurre un desplazamiento de 1.8 Å en las posiciones de los carbonos alfa de los residuos 65 a 67 (Kabsch et al. 1990).

La capacidad de inhibición de la DNasa I por actina G no es general para todas las especies o grupos zoológicos. En mamíferos como la rata (Lacks, 1981; Kreuder et al., 1984; Takeshita et al., 1995), el cerdo (Paudel y Liao, 1986) y el conejo (Yasuda et al., 1997), esta inhibición es nula o muy poco significativa. También es así en pollo (Nakashima et al., 1999), *Xenopus* (Hosomi et al., 1999) y el pez tilapia (Hsiao et al., 1997). Como se observa en la Tabla I, en la DNasa I de estas especies algunos de los aminoácidos clave en la interacción entre la DNasa I y la actina: el ácido glutámico 35, la tirosina 65 y las valinas 66 y 67 en la enzima bovina han mutado.

Tabla I. Aminoácidos clave en la interacción con la actina.

HUMANO	E 35	Y 65	V 66	V 67
BOVINO	E	Y	V	V
CERDO	E	H	V	V
OVEJA	E	Y	V	V
CONEJO	E	F	V	A
RATA	D	Y	I	I
RATON	E	Y	V	V
POLLO	D	F	L	S
ELAFE	D	Y	L	I
XENOPUS	M	V	L	I
TILAPIA	D	Y	I	V

1.8. DNasa I en los Vertebrados

La homología de secuencia aminoacídica entre las DNasas I de mamíferos varía entre 75 y 93%. La DNasa I pierde su capacidad catalítica, en mayor o menor grado, cuando un determinado conjunto de aminoácidos es mutado. Los aminoácidos pueden ser clasificados en cuatro grupos de acuerdo al siguiente criterio: (i) formar parte del sitio activo, (ii) formar parte de los sitios de unión de iones metálicos, (iii) formar parte de sitios críticos de contacto con el ADN, ubicados en la cercanía del sitio activo y (iv) formar parte de sitios periféricos de contacto al ADN (Pan et al., 1998). En las tablas II a V hemos agrupado los aminoácidos pertenecientes a estos cuatro grupos, correspondientes a 11 especies de Vertebrados.

Tabla II. Aminoácidos clave del sitio catalítico.

HUMANO	E 100	H	D	H
BOVINO	E	H	D	H
CERDO	E	H	D	H
OVEJA	E	H	D	H
CONEJO	E	H	D	H
RATA	E	H	D	H
RATON	E	H	D	H
POLLO	E	H	D	H
ELAFE	E	H	D	H
XENOPUS	E	H	D	H
TILAPIA	E	H	D	H

Tabla III. Aminoácidos involucrados en la unión al calcio.

HUMANO	E 61	D 190	D 273
BOVINO	E	D	D
CERDO	E	D	D
OVEJA	E	D	D
CONEJO	E	D	D
RATA	E	D	D
RATON	E	D	D
POLLO	E	D	D
ELAFE	E	D	D
XENOPUS	E	D	D
TILAPIA	E	D	D

Tabla IV. Aminoácidos involucrados en la unión al ADN.

HUMANO	Q 31	R 63	Y 98	R 133	N 192	Y 197	Y 233
BOVINO	R	R	Y	R	N	Y	Y
CERDO	R	R	Y	R	N	Y	Y
OVEJA	R	R	Y	R	N	Y	Y
CONEJO	R	R	Y	R	N	Y	Y
RATA	R	R	Y	R	N	Y	Y
RATON	R	R	Y	R	N	Y	Y
POLLO	R	R	Y	R	N	Y	Y
ELAFE	R	R	Y	R	N	Y	Y
XENOPUS	Q	M	Y	R	N	Y	Y
TILAPIA	K	R	Y	R	N	Y	Y

Tabla V. Aminoácidos involucrados en uniones periféricas al ADN.

HUMANO	T32	E35	T36	S65	H66	R95	N96	S97	D129	N132	T227	P 228	T 229
BOVINO	T	E	T	S	H	R	N	S	D	S	T	S	T
CERDO	T	E	T	S	H	R	S	T	D	N	S	S	H
OVEJA	T	E	T	S	H	R	N	S	D	S	T	S	T
CONEJO	S	E	T	S	H	R	R	T	D	S	T	S	T
RATA	T	D	T	T	H	R	K	S	D	S	T	S	T
RATON	T	E	T	S	H	R	K	S	D	S	T	S	T
POLLO	T	D	S	A	D	R	N	S	D	S	T	S	T
ELAFE	A	D	K	A	D	H	N	S	G	S	T	N	T
XENOPUS	Q	M	T	A	D	R	S	S	D	I	S	Q	T
TILAPIA	S	D	T	S	D	A	S	T	D	S	S	T	T

Los aminoácidos que forman parte de los primeros tres grupos están muy conservados en las DNasas I de humano (Shack et al., 1990), bovino (Lahm y Suck, 1991); ratón (Peitsch et al., 1995), rata (Polzar y Mannherz, 1990), cerdo (Paudel y Liao, 1986) y ovino (Paudel y Liao, 1986). Los aminoácidos clave en el sitio activo (Tabla II), así como los involucrados en la unión de iones metálicos (Tabla III), están conservados inclusive en Vertebrados inferiores como el pez tilapia. En el caso de los 7 aminoácidos implicados en la interacción con el ADN (Tabla IV), solo hay un cambio en uno de ellos en humanos, *Xenopus* y tilapia.

Una situación similar se observa al analizar las secuencias de enzimas tipo DNasa I como la DNAS1L3 (Rodriguez et al., 1997), DNAS1L2 (Rodriguez et al., 1997) y DNasa I muscular (Parrish et al., 1995; Pergolizzi et al., 1996), presentes en distintos tejidos humanos (Tabla VI).

Tabla VI. Aminoácidos clave para la actividad en enzimas tipo-DNasa I presentes en tejidos humanos.

DNasaI	E 100	H 156	D 234	H 274	E 61	D 190	D 273	Q 31	R 63	Y 98	R 133	N 192	Y 197	Y 233
DNasaIL2	E	H	D	H	E	D	D	Q	R	Y	R	N	Y	Y
DNasaIL3	E	H	D	H	E	D	D	R	K	Y	R	N	Y	Y
DNasaI Muscular	E	H	D	H	E	D	D	Q	V	Y	R	N	S	Y

En negro se muestran los aminoácidos del sitio activo, en azul los de la unión a iones metálicos y en rojo los de interacción con el ADN

1.8.1. DNasa I en anfibios, características especiales

La DNasa I de los anfibios merece un capítulo aparte debido a que posee características singulares. El análisis de las secuencias de DNasas I purificadas a partir del páncreas de dos ranas (*Xenopus laevis* y *Rana catesbeiana*); un sapo (*Bufo vulgaris japonicus*) y una salamandra (*Cynopus pyrrhogaster*), permitió determinar algunas características comunes entre ellas, que las distinguen de las DNasas I de los demás Vertebrados. Tiene un peso molecular promedio de

40 Kda, significativamente más alto que el de las enzimas en otras especies de Vertebrados (34 Kda) y un pH óptimo alcalino, de alrededor de 8. A partir de la traducción de sus respectivas secuencias nucleotídicas se ponen en evidencia dos características estructurales únicas de este tipo de nucleasas de anfibios: un grupo de 70 aminoácidos con un alto contenido de cisteínas (aproximadamente un 15%) cerca del extremo carboxilo terminal y la inserción de una serina en la posición 205, la cual forma parte de un dominio de unión al calcio. Otra característica única es que no poseen cadena de carbohidratos asociada. Como ya vimos anteriormente no son inhibidas por actina G, habiéndose observado cambios en los aminoácidos esenciales para la unión a la actina (Takeshita et al., 2001).

1.9. Distribución tisular

La presencia de DNasa I fue inicialmente determinada en tejidos de función digestiva como el páncreas y la parótida (Greene et al., 1963; Ball, 1971; Redman et al., 1971; Lacks, 1981; Sivakumar et al., 1998). Sin embargo, algunas actividades enzimáticas similares a la DNasa I pancreática prototipo como fuera descrita por Price (1975), en cuanto a sus requerimientos iónicos y pH óptimos, se encontraron en tejidos con funciones no digestivas tales como riñón, ganglio linfático y corazón (en concentraciones muy bajas en este último órgano) así como en el suero (Cunningham y Laskowski, 1953; Shack, 1957; Lacks, 1981; Love y Hewitt, 1979) y el lóbulo anterior de la glándula pituitaria (Shimada et al., 1998b). En el caso de las células de la glándula pituitaria, se encontró que la expresión de DNasa I era modificada durante la vida del individuo. Su concentración aumenta notablemente en la pubertad, alcanzando los niveles de expresión del páncreas, para luego ir disminuyendo con la edad del individuo (Yasuda et al., 2002).

La somatostatina induce una disminución transitoria en la expresión de la DNasa I en células del intestino delgado y en el suero (Yasuda et al., 2001). La somatostatina también inhibe la secreción de las células de la glándula pituitaria incluyendo la DNasa I, cuyos niveles bajan un 50% (Nadano et al., 1993; Yasuda et al., 1997; Takeshita et al., 2000). Se postula que la acción de la somatostatina es a través de una disminución del AMPc en una vía de transducción que involucra a una proteína G (Yasuda et al., 2001). Se ha visto que la hormona hipotalámica liberadora de hormona luteinizante, aumenta la concentración intracelular de diacilglicerol y AMPc, y que en células de la glándula pituitaria causa un aumento en la actividad DNasa I (datos de Yasuda sin publicar).

1.10. Estructura génica

Si bien la DNasa I mejor conocida es la enzima bovina, no se conocía la secuencia y organización de su gen cuando realizamos esta Tesis.

1.10.1. Organización del gen murino

El grupo de Tschopp describió la secuencia y organización del gen de la DNasa I en ratones (Genbank U00478). Está formado por 8 intrones y 9 exones, el primer intrón termina dos bases antes del inicio de la región codificante, la

cual comprende solamente parte del exón 9. En el exón 2, desde la base 628 a la 693 se encuentra codificado un péptido señal (Peitsch et al., 1995). En 1997 se secuenció la región 5' flanqueadora del gen (Genbank AJ000062). En ella se asigna una señal CAAT (agggcccaatgg) en la posición 3788 a 3799 y una señal tipo TATAbox (cctttaaacc) en la posición 3883 a 3892. En el reporte de Genbank AJ000062 se plantea la existencia de un transcripto, que surgiría por "splicing" alternativo, en el cual sería retenida parte del intrón 1. Como la región codificante del mensajero comienza en el exón 2, ambos transcriptos podrían dar origen a una proteína activa. A partir de la secuencia del mensajero obtenido de riñón y parótida (Genbank D83038) se determinó la presencia de una señal poli-A (aataaa) en la posición 1156 a 1161.

1.10.2. Estructura génica en la rata

En la rata el gen de la DNasa I (U76635), de aproximadamente 3 Kb, fue secuenciado por el grupo de Sikorska en 1997. Posee 9 exones interrumpidos por 8 intrones. Su estructura es similar a la del gen murino, con alguna diferencia en el largo de los intrones (Liu et al., 1997). En la región 5' este gen posee una secuencia única del elemento cis correspondiente a un elemento de respuesta al AMPc ubicado en la posición -309 a la -317 (Yasuda et al., 2001).

A partir de riñón se aislaron 2 transcriptos de distinta longitud (Genbank AF397150 y AF397151), el primero de los cuales retiene el intron 1. Como la región codificante comienza en el exón 2 ambos transcriptos podrían dar origen a una enzima activa (Basnakian et al., 2002). A partir de algunos tejidos y líneas celulares se identificó una gran variedad de transcriptos de distintos largos. Los mismos, algunos de los cuales están presentes en mayor concentración que el transcripto normal, son producto de "splicing" alternativo y no darían origen a proteína activa (Liu et al., 1997).

1.10.3. Estructura del gen humano

El gen humano, ubicado en el cromosoma 16 región p13.3 (Yasuda et al., 1995), de aproximadamente 3.2 Kb de largo, comprende 9 exones y 8 intrones (Yasuda et al., 1995). Todas las secuencias de las fronteras entre exones e intrones siguen la regla GT/AG (Mount, 1982). El extremo amino de la proteína es codificado por el exón 2, en cuyo extremo 5' codifica para un péptido señal. Este péptido señal consta de 22 aminoácidos con una región central de 12 aminoácidos hidrofóbicos (Shak et al., 1990). Es por esto, entonces, que el exón 1 no codificaría para ningún aminoácido. El exón 9 posee el codón de terminación (TGA) y codifica para los últimos 15 aminoácidos del carboxilo terminal aunque posee además otros 21 pares de bases no codificantes. Los otros exones tienen un largo variable, que va de 84 a 155 pares de bases. El largo de los intrones varía entre 75 a 395 pares de bases. Existe una enorme variedad de transcriptos, obtenidos a partir de líneas celulares, resultantes de "splicing" alternativo que no darían origen a una enzima con sitio activo intacto (Liu et al., 1997).

El análisis de la región 5' flanqueadora del gen permitió determinar la presencia de una posible TATA-box (cuya secuencia sería TTTAAAA) en la posición -39 a -45 y una tipo CCAAT-box en la posición -109 a -113. También se encontraron secuencias consenso de sitios de unión de diversos factores de

transcripción, entre ellos: el factor Spl (Briggs et al., 1986) en las posiciones -271 a -276 y -362 a -367, el factor Pan1 (CACCTG) correspondiente a factores de activación de la transcripción en células acinares pancreáticas, en las posiciones -196 a -201, -499 a -504 y -585 a -590, un elemento de respuesta a la hormona tiroidea (Farsetti et al., 1992), a glucocorticoides (Scheidereit et al., 1983) así como una secuencia consenso del elemento de unión del AP-2 en cuya vía de transducción de señales está involucrado el AMPc (Imagawa et al., 1987).

1.10.3.1. Polimorfismo en humanos

Mediante técnicas de isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida fue posible mostrar la presencia de varias isoformas de la DNasa I en orina (Yasuda et al., 1989) y saliva (Tenjo et al., 1993). Las distintas isoformas podrían deberse a diferencias en la estructura primaria así como en el contenido de carbohidratos de la enzima, en particular de ácido siálico (Yasuda et al., 1990).

Actualmente se conocen 6 alelos para la DNasa I en humanos. En la Tabla VII se muestran los sitios en los que los aminoácidos cambian.

Tabla VII. Fenotipos polimórficos en humanos.

Fenotipo 1	Fenotipo 2	Fenotipo3	Fenotipo 4	Fenotipo 5	Fenotipo 6
9 Gln (CAG)	Gln (CAG)	Gln (CAG)	Glu (<u>G</u> AG)	Gln (CAG)	Gln (CAG)
92 Val (GTG)	Val (GTG)	Val (GTG)	Val (GTG)	Met (<u>A</u> TG)	Val (GTG)
132 Pro (CCC)	Pro (CCC)	Ala (<u>G</u> CC)	Pro (CCC)	Pro (CCC)	Pro (CCC)
185 Arg (CGC)	Arg (CGC)	Arg (CGC)	Arg (CGC)	Arg (CGC)	Cys (<u>T</u> GC)
222 Gln (CAA)	Arg (<u>C</u> GA)	Gln (CAA)	Arg (<u>C</u> GA)	Arg (<u>C</u> GA)	Arg (<u>C</u> GA)

Datos extraídos de Kishi et al., 2001.

La base molecular de este polimorfismo consiste en mutaciones puntuales en una base, que llevan a un cambio aminoacídico. Los fenotipos 1 y 2 son los que ocurren con mayor frecuencia y como la Gln 222 está conservada entre todos los mamíferos, es probable que el fenotipo 1 sea el fenotipo ancestral. Una mutación en el exón 8 habría dado lugar al fenotipo 2. El fenotipo 3 se debe haber generado a partir del fenotipo 1 por una mutación en el exón 6 mientras que los alelos 4, 5 y 6 se habrían producido a partir del alelo 2, por mutaciones en los exones 2, 5 y 7 respectivamente (Yasuda et al., 1995; Yasuda et al., 1995; Yasuda et al., 1995; Iida et al., 1996; Iida et al., 1997; Yasuda et al., 1999; Kishi et al., 2001).

1.11. Otros miembros de la familia DNasa I

Hasta hoy se han identificado cuatro genes pertenecientes a la familia de la DNasa I: la propia DNasa I, la DNasaIL2, la DNasaIL3 o DNasa γ y la DNasa X también llamada DNasa I muscular o DNasaIL1.

1.11.1. DNasas I L2 y L3

En 1997 se determinó la existencia de ADNc de ARN mensajeros que codificarían para dos enzimas similares a la DNasa I en humanos, a las que se llamó DNasa1L2 (cuyo gen estaría ubicado en el cromosoma 16 región p13.3) y DNasa1L3 (gen ubicado en el cromosoma 3, región p14.3-p21.1). Ambos ADNc

codificarían enzimas de 299 y 305 aminoácidos, con un 56% y 46% de identidad de secuencia aminoacídica con la DNasa I respectivamente. Si bien estas enzimas no estarían glicosiladas y no podrían unirse a la actina, tendrían un péptido señal en el amino terminal y los aminoácidos del sitio activo y los de la unión al calcio y al ADN, estarían conservados (Tabla VI). Sus lugares de expresión son distintos, la DNAs1L2 se expresa en cerebro, mientras que DNasa1L3 lo hace casi exclusivamente en hígado y bazo (Rodriguez et al., 1997; Baron et al., 1998; Zeng et al., 2000).

1.11.2. DNasa I L1

En el cromosoma X, región q28, existe un gen que codifica para una proteína de 302 aminoácidos cuya secuencia presenta un 39% de homología con la DNasa I. Mediante análisis computacionales se predijo la existencia de un péptido señal en el amino terminal y un dominio transmembrana cerca del carboxilo terminal. Esta proteína (Swiss Prot P49184), posee un posible sitio de glicosilación Asp²⁶¹-Ileu-Ser y dos cisteínas que podrían formar un puente disulfuro en las posiciones 187 y 224. Los transcritos para esta enzima fueron detectados exclusivamente en tejido muscular cardíaco y esquelético. Existen dos enfermedades asociadas a la misma región cromosómica Xq28, el Síndrome de Barth y la distrofia muscular Emery-Dreifuss, pero hasta el momento en ninguno de los pacientes estudiados se han encontrado mutaciones asociadas a este gen (Parrish et al., 1995; Pergolizzi et al., 1996). Existe un alelo para este gen al que le faltan 196 pbs en la región 3' no traducida del exón 9. En este caso se ha observado un aumento en la frecuencia de este alelo en pacientes con deficiencia en maltasa ácida (Malferrari et al., 2001).

Estas enzimas comparten algunas características estructurales y funcionales que resumimos en la Tabla VII.

Tabla VII. Características de las enzimas de la familia de la DNasa I.

ENZIMA	P. SEÑAL	SECRECION	5'P	PH	Ca++/Mg++	ATA	Zn++	ACTINA
DNasa I	+	+	+	7.0	+	+	+	++
DNasaIL2	+	+	+	5.6	+	++	+	-
DNasaIL3(γ)	+	-	+	7.2	+	++	+	-
DNasaIX	+	-	+	6.8	+	+	+	+

1.12. DNasa I y lupus: efectos de la delección del gen de la DNasa I

El lupus eritematoso sistémico es una enfermedad autoinmune multifactorial que se caracteriza por la presencia de anticuerpos dirigidos contra ADN desnudo o asociado a histonas. Los complejos inmunes resultantes se acumulan en los vasos sanguíneos, glomérulos renales y articulaciones causando reacciones de hipersensibilidad que resultan en lisis vascular, glomerulonefritis y artritis (Pisetsky, 1998; Ehrenstein, 1999). En individuos con lupus, los niveles de DNasa I sérica son significativamente menores que en individuos sanos (Chitrabamrung et al., 1981). Ocurre lo mismo en un modelo animal de esta enfermedad, los ratones NZB/NZW (Macanovic y Lachmann, 1997). La DNasa I, presente en el suero, podría ser responsable de la eliminación

del ADN de dichos complejos ayudando a evitar la aparición de los síntomas de la enfermedad (Davis et al., 1999).

Una de las evidencias más fuertes a favor de esta hipótesis, fue obtenida por Moroy y colaboradores quienes generaron ratones deficientes en uno u ambos alelos del gen de la DNasa I. A los 6 meses de edad los animales presentaban síntomas similares al lupus y en algunos casos llegaban a morir (Napierei et al., 2000). Recientemente se reportó la existencia de dos pacientes con lupus eritematoso sistémico en los que habían ocurrido mutaciones sin sentido en el exón 2 de la DNasa I, en ellos se observó una disminución en la concentración de DNasa I sérica (Yosutomo et al., 2001).

2. Degradación del núcleo y otros organelos en las células fibra en el cristalino de los Vertebrados.

El cristalino de los Vertebrados es un órgano transparente cuya función es enfocar la luz sobre la retina neural. Su formación y diferenciación es el resultado de una serie de inducciones que ocurren muy temprano en el desarrollo embrionario. La vesícula óptica induce al ectodermo suprayacente a formar la placoda cristalínea, una región de células ectodérmicas alargadas en las que se inicia la expresión de proteínas características: las cristalinas. Un poco más adelante en el tiempo, la placoda cristalínea se invagina y separa del ectodermo, formando la vesícula cristalínea. Las células de la mitad posterior de esta vesícula, bajo la influencia de la retina neural, se elongan y llenan la luz vesicular. Se forman así las fibras primarias. Más tarde en el desarrollo, las células de la región ecuatorial saldrán de ciclo, comenzarán a elongarse y diferenciarse en fibras secundarias (Figura 7), proceso que ocurre durante toda la vida del individuo. Es por eso que las fibras más jóvenes irán desplazando a las previas hacia regiones profundas del cristalino (Piatigorsky, 1981).

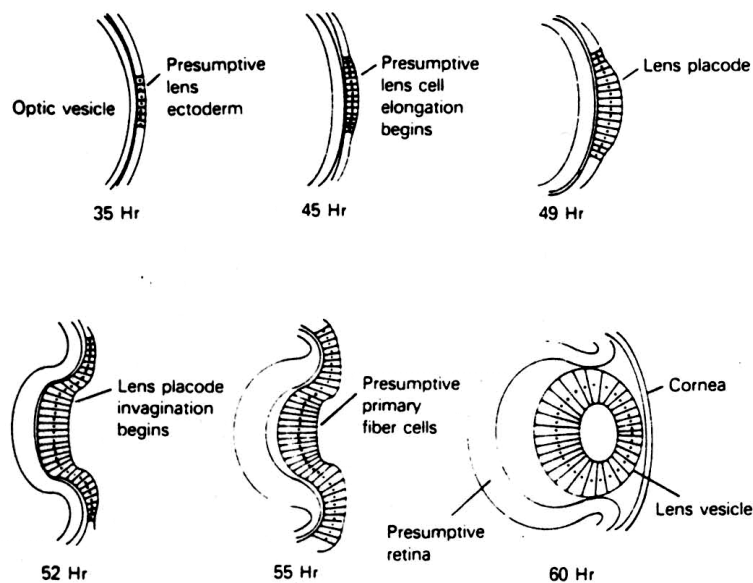


Figura 7. Representación esquemática del desarrollo temprano del cristalino de pollo. Extraído de Piatigorsky, 1981.

El cristalino consta entonces de dos tipos celulares: células epiteliales ubicadas en la región anterior y fibras, células elongadas en las que se expresan proteínas características (beta y gama cristalinas entre otras) (Figura 8). En fibras más profundas ocurre la degradación de todos los organelos citoplásmicos con membrana, incluyendo el núcleo (Piatigorsky, 1981). Esta pérdida de organelos es fundamental para mantener la transparencia del

órgano, errores en este evento se asocian con cataratas congénitas en humanos (Zimmerman y Font, 1966) y en modelos animales (Hamai et al., 1974).

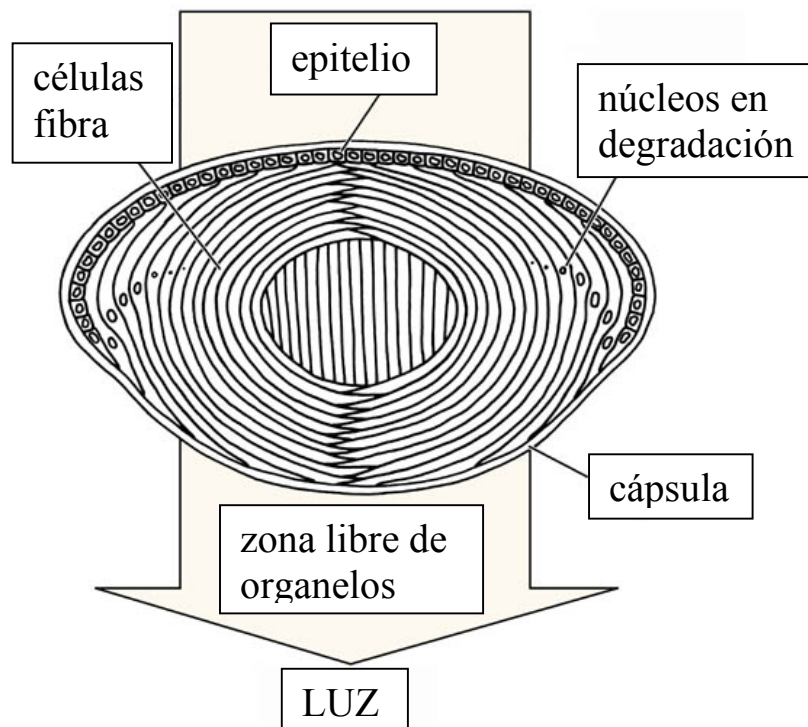


Figura 8. Representación esquemática de corte transversal de cristalino de mamífero.

Dirección: http://www.eb.tuebingen.mpg.de/dep3/research_interests/eye_lens_dev.html

2.1. Diferenciación de células fibra

El proceso de diferenciación de células fibra ocurre desde temprano en el desarrollo y continúa durante toda la vida adulta. Por lo tanto en la región periférica del cortex adulto, donde ocurre la diferenciación, es posible observar una progresión de células en distintos estadios de diferenciación, desde células epiteliales que recién comienzan a elongarse, hasta células que casi han completado el proceso. Esta región se conoce como “bow” o arco en los mamíferos y en el caso de primates abarca entre 50 y 100 células (Bassnett, 1997).

Durante el proceso de diferenciación se producen cambios en el esqueleto de membrana y en los filamentos intermedios. La espectrina comienza a fragmentarse hacia la segunda mitad del período embrionario, momento que coincide con la formación de la zona libre de organelos (ZLO) (Kuwabara y Imaizumi, 1974; Kuwabara, 1975; Vrensen et al., 1991). Los filamentos intermedios, compuestos por vimentina (Ramaekers et al., 1980), están presentes en todas las células del epitelio y en las fibras más jóvenes, pero ausentes en las más viejas (Bradley et al., 1979). El análisis detallado de este

proceso de pérdida muestra que el mismo ocurre drásticamente y en una región bien definida del cortex, a una profundidad de no más de 3 mm desde la cápsula en cristalinos de bovinos adultos (Sandilands et al., 1995). La sobreexpresión de vimentina en ratones transgénicos, causa serios trastornos en la elongación y denucleación de las fibras (Capetanaki et al., 1989).

2.2. Generación de la zona libre de organelos

La pérdida de organelos de las fibras ocurre en un intervalo de pocas horas y en una región que corresponde a unas pocas células de ancho. La degradación prácticamente sincrónica de mitocondrias, retículo endoplásmico, aparato de Golgi y núcleo, genera una región especial en el cortex que ha sido llamada zona libre de organelos (ZLO). A medida que avanza el desarrollo, la zona libre de organelos crece, expandiéndose hacia la periferia, en la misma proporción que crece el órgano, alrededor de 80 micras por día, que corresponden a unas 10.000 células en el pollo (Bassnet y Beebe, 1992; Bassnett, 1995).

2.2.1. Posibles eventos desencadenantes de la degradación de organelos

En el caso de embriones de pollo, la pérdida de organelos en las fibras centrales es evidente a partir del día 12 del desarrollo (E12). La distancia entre el borde de la ZLO y la periferia del cristalino permanece constante durante todo el resto del desarrollo y vida postnatal. Teniendo esto en cuenta, Steven Bassnett ha propuesto que la clave para desencadenar los eventos de degradación podría estar en el tamaño del cristalino (Bassnet y Mataic, 1997). La acidificación del citosol, una disminución en la disponibilidad de oxígeno o el aumento en la concentración de productos de desecho, en relación al establecimiento de gradientes de difusión a medida que el órgano aumenta de volumen (Bassnett et al. 1987), serían buenos candidatos. Bassnett ha propuesto que alguno de estos cambios intracelulares afecte a mitocondrias y retículo endoplásmico, reservorios intracelulares de calcio. Su degradación llevaría a un aumento del calcio citosólico libre, lo que podría desencadenar la degradación nuclear. La lámina nuclear se desensamblaría por degradación o fosforilación de las laminas, esto último mediado por el complejo cdc2-ciclinaB (He et al., 1998). El lapso de 48 horas entre la ruptura de la lámina nuclear y la degradación del ADN observado en las fibras del cristalino de pollo, permitiría que la cromatina quedase accesible a nucleasas citosólicas o daría tiempo para la activación de posibles enzimas nucleares (Bassnet y Mataic, 1997).

Otro desencadenante que ha sido postulado es el factor tumoral necrótico (TNF), para el cual existen receptores en las células del cristalino (epitelio y fibras). Las células del epitelio anterior del cristalino de las aves, pueden diferenciarse en fibras *in vitro* formando estructuras globulares llamadas cuerpos lentoides. Este evento de diferenciación implica también la fragmentación de la cromatina, que ha sido detectada mediante la técnica TUNEL. Cuando se agrega TNF a estos cultivos, hay un aumento en el número de núcleos TUNEL positivos, por otra parte se produce un efecto inverso al usar anticuerpos contra los receptores de TNF. Teniendo en cuenta estos resultados,

se sugirió un rol activador de este factor en los eventos de degradación nuclear de las fibras *in vivo* (Wride y Sanders, 1998).

Recientemente se ha propuesto que la enzima lipoxigenasa 15 (LOX15) sería un mediador temprano en la degradación de organelos durante la diferenciación de eritrocitos y fibras cristalineanas. Esta enzima se uniría a la membrana del retículo endoplásmico de forma calcio-dependiente, donde formaría estructuras tipo poro (cuya formación en liposomas fue comprobada mediante microscopía electrónica de transmisión). Al integrarse LOX15 a la membrana del retículo endoplásmico lo permeabilizaría, lo que resultaría en la liberación de proteínas desde la luz del mismo hacia el citoplasma. Es posible que además esta permeabilización permita la degradación del propio retículo endoplásmico, al permitir el acceso del sistema ubiquitina-proteosoma. En el cristalino, el doble marcado de retículo endoplásmico y LOX15, evidencia que hay un aumento importante de la enzima en aquellas fibras en las que el organelo se está desintegrando (van Leyen et al., 1998).

2.3. Procesos de degradación de organelos

Como ya dijimos anteriormente, para mantener la transparencia del órgano es fundamental que sus organelos citoplásmicos sean degradados. Esta degradación programada de los organelos es una de las características más sobresalientes de las células fibra, al tiempo que una de las menos conocidas. Si bien no están completamente dilucidados los mecanismos de desencadenamiento y progresión de este proceso, es claro que está estrictamente regulado en cuanto al tiempo y lugar en el que se desarrolla: su duración es de unas pocas horas y ocurre en una región que abarca unas pocas células de ancho.

En particular la degradación de organelos ha sido muy bien descrita en cristalinos de embriones de pollo, mostrando que en una región de no más de dos células de ancho, las mitocondrias, el retículo endoplásmico y los núcleos son degradados rápida y sincrónicamente. Se trata de un proceso de cierta selectividad, ya que el citoesqueleto de actina no está afectado (Bassnett 1992, 1995; Bassnett y Beebe, 1992).

2.3.1. Mitocondrias

En las células epiteliales, con independencia de la etapa del desarrollo, las mitocondrias se encuentran agrupadas alrededor del núcleo. Sin embargo en las fibras están ubicadas en todo el citoplasma, orientadas en paralelo al eje mayor de la célula. Este organelo cambia de tamaño en ambos tipos celulares, son más pequeños en las células epiteliales mientras que en las fibras pasan a ser estructuras filamentosas de más de 100 micras de largo (Bassnet, 1992).

En el pollo, al octavo día del desarrollo (E8), las mitocondrias de las fibras centrales comienzan a fragmentarse y en E10, son estructuras puntiformes, cuya membrana interna ha perdido su continuidad. En E12 las mitocondrias de las fibras han desaparecido por completo, en una región particular del cortex ubicada aproximadamente a 300 micras del límite del cristalino. En una célula dada, este proceso ocurre en menos de cuatro horas (Bassnett y Beebe, 1992).

En el cristalino de ratas y primates la evolución del proceso de degradación de las mitocondrias es similar al descrito en el pollo. Mitocondrias y núcleos desaparecerían al unísono y estarían ausentes en las fibras cuyos extremos han alcanzado las líneas de sutura o que han llegado a la zona del epitelio central (Bassnett, 1992; Bantseev et al., 1999).

2.3.2. *Retículo endoplásmico*

Este organelo está presente en células epiteliales y del “annular pad”, una región ecuatorial engrosada del cristalino de las aves, en la que comienza la elongación celular. En las células epiteliales y en las del “annular pad”, el retículo endoplásmico se distribuye alrededor del núcleo, formando una red de estructuras tubulares y vesiculares. En las fibras corticales más superficiales, el retículo endoplásmico se extiende en todo el espacio citoplásmico. También es posible observar una particular concentración del mismo en los extremos anterior y posterior de las fibras. Sin embargo, en fibras más profundas, el retículo endoplásmico desaparece y la transición entre fibras con y sin este organelo es bastante abrupta (Bassnett, 1995).

2.3.3. *Aparato de Golgi*

El aparato de Golgi está presente en las células del epitelio y “annular pad”. En las células epiteliales, esta estructura en forma de sacos aplanados está concentrada alrededor del núcleo, en particular en la región apical de la célula. En las células epiteliales del “annular pad”, el aparato de Golgi se aleja de la membrana apical y adquiere forma de cinta. Posteriormente este organelo comienza a fragmentarse siendo ya prácticamente indetectable en las fibras superficiales. Los remanentes de aparato de Golgi generalmente están ubicados en la cercanía de la región basal del núcleo y en el citoplasma cortical (Bassnett, 1995).

2.3.4. *Núcleo*

2.3.4.1. *Degradación en las fibras primarias*

En fibras primarias de embriones tempranos de ratón, se ha descrito, mediante microscopía electrónica, la presencia de un granulado electrondenso, en núcleo y citoplasma, que se condensa y forma cuerpos osmofílicos probablemente compuestos por nucleosomas. Estos cuerpos osmofílicos se ubican en la cercanía de la membrana plasmática y posteriormente son incorporados a vesículas con enzimas hidrolíticas. Parte de los productos de degradación salen fuera de la célula y llegan a los polos anterior y posterior de la misma, donde podrían terminar de ser degradados o expulsados fuera del cristalino (Vrensen et al., 1991).

2.3.4.2. *Degradación en las fibras secundarias*

La secuencia de eventos que llevan a la denucleación en las fibras secundarias es diferente a la de las fibras primarias. En las aves, durante el proceso de denucleación, los núcleos pasan por una serie de cambios que incluyen la compactación de la cromatina, degradación de la lámina nuclear, pérdida de la integridad de la envoltura nuclear y finalmente la fragmentación

del ADN. Al inicio de este proceso, los núcleos son ovalados, con uno o dos nucléolos prominentes, lámina nuclear y ADN intactos. Los primeros cambios visibles son en la forma de los núcleos, que se vuelven más elongados y el inicio de la compactación de la cromatina hacia la periferia nuclear (Sanwal et al., 1986). Posteriormente, los núcleos comienzan a redondearse y se observan acúmulos de cromatina condensada, al tiempo que se forman agujeros en la lámina nuclear y se detectan los primeros cortes en el ADN. En una siguiente etapa estos núcleos redondos disminuyen de volúmen, compactan toda su cromatina al tiempo que la fragmentación del ADN y de la lámina nuclear se completan. Por último, los núcleos colapsan, se vuelven hiperpicnóticos y desaparece la lámina nuclear (Bassnett y Mataic, 1997).

En bovinos el proceso es similar, la pérdida de integridad de la lámina nuclear es un evento temprano en la denucleación y ocurre concomitantemente con los cambios de forma del núcleo. La degradación de la cromatina comenzaría una vez perdida la integridad de la envoltura nuclear. En esta especie también se estudiaron los cambios en el nucléolo y los "coiled bodies". Proteínas marcadoras de ambos, fibrilarina y coilina respectivamente pasan de sus ubicaciones normales hasta formar grandes agregados, que finalmente desaparecen (Dham et al., 1998). En primates los cortes 3'OH libres en el ADN aparecen después de la pérdida de la envoltura nuclear (Bassnett, 1997).

2.4. Nucleasas cristalineanas

Diversas actividades nucleasa han sido encontradas en las células cristalineanas y hasta ahora no se ha podido determinar específicamente el rol de cada una de ellas (si es que todas lo tienen) en el proceso de degradación nuclear de las fibras. Estas actividades nucleasa han sido clasificadas en tres grupos teniendo en cuenta sus requerimientos catiónicos y de pH (Counis et al., 1998).

2.4.1. Nucleasas calcio, magnesio-dependientes tipo DNasa I

Mediante ensayos en geles de actividad nucleasa se determinó la presencia, en diferentes poblaciones de fibras de cristalinos de pollos postnatales, de dos actividades nucleasa de 30 y 60 Kda de movilidad relativa. Estas mismas actividades enzimáticas, que fueron encontradas en fibras de cristalinos embrionarios y de animales adultos, realizan cortes que dejan extremos 3'OH libres en el ADN y son inhibidas por actina G. Esta última característica las señala como enzimas de la familia de la DNasa I (Arruti et al., 1995). Counis y colaboradores detectaron actividades nucleasa calcio, magnesio-dependientes en células epiteliales y fibras. Mostraron además que anticuerpos anti-DNasa I reconocían la presencia de varias proteínas en estas células, una de ellas de 32 Kda de movilidad relativa (Torriglia et al., 1995).

2.4.2. Nucleasas ácidas, catión-independientes tipo DNasa II

La mejor conocida de este tipo de nucleasa es la DNasa II, enzima formada por dos subunidades de 35 y 10 Kda respectivamente. Esta enzima cliva el ADN a pH ácido dejando extremos 3'P libres en el ADN. El grupo de Counis mostró la presencia de una actividad nucleasa catión independiente,

activa a pH 5.5 en fibras de cristalino de embrión de pollo (Torriglia et al., 1995). En Western-blots de extractos de fibras, revelados con un anticuerpo anti-DNasa II, detectaron tres bandas de 18, 23 y 60 Kda. La inmunolocalización en cortes histológicos mostró la presencia de las proteínas en los núcleos de las fibras en diferenciación.

En células epiteliales también se detectó este tipo de actividad nucleasa pero en menor concentración que en las fibras. El resultado de Western-blots con este anticuerpo son dos bandas de 18 y 100 Kda respectivamente, cuya ubicación citoplásmica fue comprobada mediante inmunodetección *in situ*.

2.5.3. Nucleasas dependientes de un unico catión

En cristalinos de pollo embrionarios se detectaron actividades nucleasa dependientes de calcio o magnesio, mediante ensayos de degradación en núcleos aislados (Muel, 1986).

3. Degradación nuclear en la apoptosis

La muerte celular programada es un mecanismo esencial en eventos tan importantes en la vida de un individuo multicelular como la morfogénesis, diferenciación celular y homeostasis (Chaturvedi et al., 1999; Oppenheim, 1991; Wilson et al., 2000). Tal es así que algunas enfermedades involucran fallas en el programa de muerte celular, entre ellas el cáncer (Carson et al., 1993; Barr et al., 1994; Jacobson et al., 1997; Hetts, 1998).

Una forma de muerte celular programada es la apoptosis, la que se caracteriza por una serie de cambios bioquímicos y morfológicos entre los que se incluyen la formación de “blebs” en la membrana plasmática, la fragmentación del citoesqueleto de actina, la fragmentación de mitocondrias, retículo endoplásmico y aparato de Golgi, así como cambios nucleares entre los que destacamos la degradación de la lámina nuclear, la condensación de la cromatina y fragmentación del ADN. Esto resulta en una disminución del volumen celular total y finaliza con la formación de cuerpos apoptóticos que son fagocitados por macrófagos o células vecinas (Kerr et al., 1972; Wyllie, 1980; Yuan et al., 1993; Vaux et al., 1999; Hart et al., 1996).

3.1. Eventos nucleares

Durante la apoptosis ocurre una serie de eventos nucleares característicos. Entre ellos: cambios en el balance iónico y en el transporte activo núcleo-citoplasma, degradación de proteínas clave en el mecanismo de reparación del ADN, degradación de la lámina nuclear y condensación y fragmentación de la cromatina (Robertson et al., 2000).

3.1.1. Activación de agentes inductores de la compactación de la cromatina

Acinus es una proteína nuclear de 17 Kda capaz de inducir la condensación de la cromatina sin que ocurra degradación del ADN. Sus formas inactivas son blancos de las caspasas durante la apoptosis. Mediante Western-blots sobre extractos de células sanas, se detectó la presencia de tres bandas de 220, 98 y 94 Kda respectivamente, que representan las formas inactivas de esta proteína. *In vivo* esta proteína tiene una localización mayoritariamente nuclear, por lo que la caspasa 3 deberá ser translocada al núcleo para poder clivarla y generar su forma activa. El rol de Acinus en la condensación de la cromatina durante la apoptosis fue determinado realizando ensayos de transfección con oligonucleótidos antisentido para el mensajero de acinus en células HeLa. Los resultados mostraron un retraso en la condensación de la cromatina en cultivos tratados con inductores de apoptosis como etopósido (Sahara et al., 1999).

MST1 es una serin-treonin proteín quinasa ubicua, que se activa durante la apoptosis por clivaje de su extremo carboxilo terminal y por fosforilación (Graves et al., 2001). Una vez realizado el clivaje por la caspasa, esta proteína pierde las señales de exclusión nuclear y es translocada al núcleo, induciendo la condensación de la cromatina (Ura et al., 2001).

3.1.2. Degradación de componentes de la matriz nuclear

NumA (nuclear/mitotic apparatus protein), tiene un rol en el ensamblado de los polos del huso mitótico y más recientemente ha sido señalada como un componente de la matriz nuclear con un rol en el mantenimiento de la arquitectura del núcleo interfásico (Merdes y Cleveland, 1998). En células interfásicas sanas, NUMA está distribuída por todo el nucleoplasma, excepto en el territorio nucleolar, por lo que co-localiza con el ADN. Una vez inducida la apoptosis esta proteína es excluída de las grandes masas de cromatina condensada. El análisis por Western-blot mostró que esta proteína, de 240 Kda de movilidad relativa, era clivada en células apoptóticas generando un fragmento de 190 Kda. Este ha perdido la región carboxilo terminal en la que se encuentran las señales de localización nuclear (Gueth-Hallonet et al., 1997).

3.1.3. Degradación de la lámina nuclear

La función de la lámina nuclear es bien conocida, provee de sitios de anclaje para la cromatina, da un soporte estructural para la envoltura nuclear y contribuye a la organización de la arquitectura del núcleo interfásico y del transporte fuera y dentro del núcleo. Está compuesta por un conjunto de proteínas llamadas laminas que pertenecen a la familia de filamentos intermedios. Se ha sugerido que la degradación de las laminas por parte de las caspasas es un evento temprano en la apoptosis (Rao et al., 1996), por lo que el desensamblado de la lámina nuclear precedería a la fragmentación de la cromatina (Lazebnik et al., 1993; Oberhammer et al., 1994; Naemati et al., 1995). En timocitos inducidos con glucocorticoides, la degradación de la lámina nuclear no es necesaria para el inicio de la fragmentación de la cromatina en donde se generan fragmentos de más de 50 Kbs, pero ocurre antes de la generación de los fragmentos oligonucleosómicos (Weaver et al., 1996; Kihlmark et al., 2001).

3.1.4. Activación de CAD

En células en proliferación, CAD (Caspase Activated DNase) es sintetizada asociada a su inhibidor específico, ICAD. Esta proteína inhibidora tiene además un rol de chaperona ya que al unirse a la cadena nascente de CAD, ayuda a su correcto plegamiento. La cascada de activación de caspasas, activa a la caspasa 3 que cliva a ICAD cuya degradación libera a CAD (Nagata, 2000).

3.2. Fragmentación de la cromatina

Si bien la fragmentación del núcleo puede ocurrir en más de una forma, es un proceso de elevadísima generalidad, lo que indica su importancia en la apoptosis, tal vez facilitando la posterior eliminación de los cuerpos apoptóticos (Dini et al., 1996). Como dijimos anteriormente, entre los eventos nucleares se destaca la fragmentación del ADN, el que se degrada en fragmentos de alto y bajo peso molecular (Robertson et al., 2000). Esta fragmentación ocurre en todo el núcleo, incluyendo regiones de cromatina condensada (Falcieri, 1994).

Hewish y Burgoyne (1973) demostraron que la cromatina de núcleos aislados de hepatocitos puede ser digerida por nucleasas endógenas, en

presencia de cationes divalentes. Esto llevó a la demostración de los nucleosomas como unidad básica de organización de la cromatina. Posteriormente se mostró que la cromatina se organiza en loops de fibras de 30 nm, cuyo peso molecular sería de 50 Kbs y que esos loops a su vez se organizan en rosetas de 300 Kbs para formar los cromosomas (Filipsky et al., 1990). En esta compleja organización de la cromatina existen sitios en los que el ADN queda expuesto al ataque nucleolítico: el ADN espaciador internucleosómico y los sitios de anclaje de la cromatina a la lámina y esqueleto nucleares (Laemmli et al., 1992).

Actualmente se considera que la fragmentación del ADN dentro de la célula apoptótica ocurre en etapas que se caracterizan por el tamaño de los fragmentos generados. En la apoptosis el clivaje del ADN comienza generando fragmentos de 50 a 300 Kbs, que finalmente se reducirán a fragmentos oligonucleosómicos. Estos últimos aparecen en etapas tardías de la apoptosis y en sitios donde hay elementos repetidos de ADN con un rol estructural en la cromatina (Oberhammer et al., 1993; Walker et al., 1991; Zhivotovsky et al., 1994; Lagarkova et al., 1995; Wyllie, 1980; Collins et al., 1997; Loukkamaki et al., 1993). Como puede verse, existe una coincidencia entre el tamaño de los fragmentos de ADN generados durante la apoptosis y los sitios de exposición del ADN en los dominios de organización de la cromatina, por lo que ha sido propuesto que el tamaño de los fragmentos de ADN está en relación con los órdenes de organización topológica de la cromatina dentro del núcleo en el momento de ocurrir la fragmentación. También se ha propuesto una relación entre la generación de los fragmentos oligonucleosómicos y los cuerpos apoptóticos (Kyprianou et al., 1990; Catchpoole et al., 1995).

La generación de los grandes fragmentos de ADN ocurre siempre; sin embargo existen algunos tipos celulares en los que no se forman los fragmentos oligonucleosómicos (Ucker et al., 1992; Oberhammer et al., 1993; Zakeri et al., 1993). El comienzo de la degradación de la cromatina en fragmentos de alto peso molecular acompaña el comienzo de la compactación de la cromatina, mientras que la formación de los fragmentos oligonucleosómicos, como ya dijimos anteriormente, coincide con la formación de los cuerpos apoptóticos (Ghibelli, 1995). Ambas etapas de la fragmentación son separables y aparentemente serían distintas nucleasas las encargadas de llevarlas a cabo ya que el requerimiento iónico cambia en cada una de ellas (Pandey et al., 1994). En una primera instancia el ataque nucleolítico ocurriría a intervalos mayores de 300 Kbs y sólo en presencia de magnesio. Luego, en presencia de magnesio y calcio, este último a concentraciones menores a 50 μ M, se generarían los fragmentos de 50 Kbs. Finalmente, en presencia de magnesio y concentraciones mayores de calcio, se cortaría el ADN espaciador y aparecerían los fragmentos oligonucleosómicos (Walker et al., 1994). Actualmente se están realizando grandes esfuerzos para avanzar en el establecimiento de la identidad de la, o las enzimas involucradas en la degradación de la cromatina.

3.3. Nucleasas apoptóticas

Se han realizado numerosos esfuerzos para identificar la o las nucleasas responsables del proceso de fragmentación de la cromatina que tiene lugar durante la apoptosis. Se debe tener en cuenta la posibilidad de que las nucleasas implicadas varíen dependiendo de la etapa de la fragmentación, el tipo celular o el estímulo desencadenante del programa apoptótico. Hasta el presente se han descrito más de veinte enzimas, entre ellas las más conocidas son la DNasa II, la DNasa dependiente de caspasas (CAD), la DNasa gamma y la DNasa I.

3.3.1. DNasa II

La DNasa II es muy bien conocida en cuanto a su rol como nucleasa lisosomal, por lo que tiene una amplia distribución tisular. No requiere de la presencia de cationes y se activa únicamente a pH ácido (4-5). Es inhibida por el ácido aurintricarboxílico (ATA) y zinc, inhibidores generales de nucleasas. Su rol en la apoptosis fue propuesto en 1992 por Eastman y colaboradores trabajando con una línea de células de ovario de hamster chino (CHO) (Barry y Eastman, 1992; Eastman, 1994). Esta enzima produce fragmentos de ADN con extremos 3'P libres, lo cual no la hace una buena candidata como enzima apoptótica. Sin embargo, podría estar involucrada en etapas tardías de la apoptosis ya que la degradación de la cromatina continúa una vez que los cuerpos apoptóticos han sido fagocitados por macrófagos. Se ha propuesto que esta enzima, o similares presentes en el lisosoma de las células fagocitantes, serían las encargadas de finalizar la degradación del ADN (Odaka et al., 1999; McIlroy et al., 2000).

3.3.2. Nucleasa dependiente de caspasas (CAD)

En células interfásicas sanas el complejo ICAD/CAD, formado por una molécula inhibidora ICAD y la nucleasa CAD, se encuentra en el núcleo (Samejima y Earnshaw, 1998). CAD es una nucleasa de ≈ 40 Kda en cuya secuencia aminoacídica se encuentra una señal de localización nuclear. La activación de la cascada de caspasas durante la apoptosis lleva a que la caspasa 3 degrade a ICAD, liberando a CAD. Esta nucleasa es activa a pH neutro y requiere de magnesio para actuar (Enari et al., 1998; Liu et al., 1997; Liu et al., 1998).

Una característica única de esta nucleasa es que su actividad se estimula por la presencia de la histona H1 y la proteína HMG-2 (proteína 2 del grupo de alta movilidad), las que se localizan en el ADN espaciador internucleosómico. El clivaje de ICAD por las caspasas libera a CAD para que ésta forme complejos oligoméricos con actividad nucleasa, sensibles a estimulación por H1 y por HMG-2. La interacción con estas proteínas llevaría la nucleasa a la región del ADN espaciador. CAD realiza cortes de cadena doble dejando extremos romos o de los que sobresale una sola base en el extremo 5'P y 3'OH (Liu et al., 1999). En células de ratones deficientes en el complejo CAD/ICAD no ocurre fragmentación de la cromatina en fragmentos de 50 Kbs, pero no parece afectarse el normal desarrollo y mantenimiento de los tejidos (Zhang et al., 2000).

3.3.3. DNasa γ

A partir de timocitos apoptóticos de ratón se purificó una nueva actividad nucleasa tipo DNasa I, a la que se llamó DNasa γ . Esta enzima, de 33 Kda de peso molecular, presenta un máximo de actividad a pH neutro y requiere calcio y magnesio. Entre sus inhibidores se encuentran el ATA y el ion zinc, pero no es inhibida por actina G. Su acción genera fragmentos de ADN con extremos 3'OH y 5'P libres. Se encuentra presente en alta concentración en bazo, ganglios linfáticos, timo, hígado y riñón (Shiokawa et al., 1997). La sola sobreexpresión de esta enzima en células HeLa S3 no causa la muerte celular, pero sí ocurre en un alto porcentaje de células si las mismas son tratadas con ceramida, lo que sugiere la existencia de mecanismos de inhibición en el citoplasma de las células en condiciones normales (Shiokawa et al., 1998). En células sanas, la DNasa γ se localiza en la región perinuclear y es translocada al núcleo una vez inducida la apoptosis, posiblemente luego de ser activada por mecanismos postraduccionales (Shiokawa et al., 2001).

3.3.4. DNasa I

Tschopp y colaboradores mostraron que la nucleasa extraíble de núcleos aislados a partir de timocitos apoptóticos inducidos con glucocorticoides, responsable de la degradación internucleosómica del ADN era funcional y antigénicamente indistinguible de la DNasa I e inhibible por actina G (Peitsch et al., 1993). El tratamiento de células con anticuerpos anti-DNasa I resulta en la adquisición de cierta resistencia a la fragmentación del ADN frente a estímulos farmacológicos (Puccetti et al., 1995; Madaio et al., 1996; Yanase et al., 1997). Cuando se elimina la expresión de DNasa I en células Jurkat, sensibles a la inducción por fármacos, éstas se vuelven resistentes y no se observan fragmentos oligonucleosómicos al ser estimuladas por drogas (Oliveri et al., 2001).

Se ha descrito la posible participación de la DNasa I en procesos apoptóticos existentes en procesos patológicos, como los causados por la falta de testosterona en las células de la próstata y en el tratamiento de linfomas cutáneos por luz ultravioleta, así como también en situaciones fisiológicas como en la renovación de los enterocitos. Las células de la próstata dependen de la presencia de testosterona para sobrevivir. Cuando se corta el suministro de esta hormona las células mueren por apoptosis. Se determinó un aumento en la expresión de DNasa I, a nivel transcripcional y traduccional, 3 días después de la falta de testosterona, así como su translocación al núcleo (Rauch et al., 1997). En el caso de linfomas cutáneos, uno de los tratamientos utilizados es la irradiación con luz ultravioleta de alta longitud de onda (340-400 nm). Se ha observado que este tratamiento desencadena el programa apoptótico. A nivel molecular se produce la inducción de la expresión de DNasa I, su acumulación en el citoplasma y final translocación al núcleo (Morita et al., 1997; Kobyletzki et al., 2000).

Es bien conocido que las células epiteliales de las vellosidades del intestino delgado migran en el lapso de 48 horas desde el fondo de las criptas hasta el extremo de las vellosidades, en donde mueren por apoptosis (Potten et

al., 1992). Se ha detectado un gradiente de concentración de DNasa I con un máximo en las células que se encuentran hacia el extremo de la vellosidad, en las que el ADN presenta cortes con extremos 3'OH libres (Polzar et al., 1994).

La transfección de células COS-1 con un vector de expresión para la DNasa I permitió determinar la distribución subcelular de la enzima. La DNasa I se distribuye en la vía de secreción de proteínas: retículo endoplásmico y aparato de Golgi (concentración alrededor del núcleo) y en vesículas de secreción (patrón puntiforme) así como en la cisterna perinuclear. La sobreexpresión provoca apoptosis en muchas de las células, observándose la desintegración nuclear, casos en los cuales la señal de la DNasa I se encontró en el núcleo. Al estudiar la distribución de la enzima en función del tiempo se observó que cuando ya había condensación de la cromatina y deformación del núcleo, la DNasa I todavía estaba confinada en el retículo endoplásmico y aparato de Golgi. Sin embargo, cuando lo que queda son remanentes de cromatina condensada, la DNasa I estaba en el núcleo (Peitsch et al., 1993).

En esta Tesis demostramos la presencia de ARN mensajeros que codifican la DNasa I en células del epitelio del cristalino bovino adulto, así como de transcritos provenientes de "splicing" alternativo. También secuenciamos la región codificante del gen de la DNasa I bovina. Mostramos que la enzima está presente en células epiteliales y fibras del cristalino y el cambio en su localización subcelular durante el proceso de diferenciación de las células fibra. Asimismo demostramos la translocación de la DNasa I al núcleo de células apoptóticas y planteamos un posible rol para esta enzima en etapas tardías de la degradación del ADN, una vez desensamblada la envoltura nuclear.

II. RESULTADOS

1. Existencia de ARN mensajeros de DNasa I en el cristalino

En nuestro laboratorio habíamos demostrado la presencia de una actividad nucleasa similar a la DNasa I en cuanto a sus requerimientos iónicos y de pH, así como su inhibición por actina en el cristalino de pollo. Como primer objetivo nos propusimos buscar el ARN mensajero de la DNasa I en células del cristalino bovino adulto. Para esta búsqueda decidimos utilizar procedimientos de RT-PCR. La secuencia del ARN mensajero de la DNasa I pancreática bovina había sido determinada por Liao y colaboradores (1998) y estaba disponible en Genbank (número de acceso AJ001538). A partir de esta secuencia diseñamos oligonucleótidos cebadores que nos permitieran amplificar toda la región codificante del mismo.

Preparamos ARN total a partir de células BEL (células del epitelio cristalino bovino *in vitro*) y de epitelio cristalino. El perfil del ARN total obtenido en las extracciones nos indicó que no estaba degradado, ya que las bandas correspondientes al ARN ribosomal de 18 y 28 S estaban definidas (Figura 9).

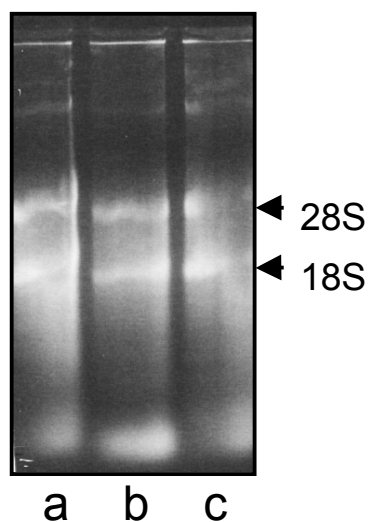


Figura 9. Electroforesis del ARN total de células BEL, fibras cristalinas y retina neural de bovino adulto. a. células BEL, b. fibras cristalinas, c. retina neural. Las fibras cristalinas y la retina neural fueron utilizadas como controles del procedimiento de purificación en tejidos con un alto contenido proteico y de ADN respectivamente. Coloración con bromuro de etidio.

Obtuvimos resultados similares en todas las extracciones realizadas. El estado del ARN purificado también fue controlado mediante medidas espectrofotométricas. Para la síntesis del ADN copia sólo utilizamos preparaciones de ARN en las que habíamos verificado su integridad por ambos métodos. En cada una de las purificaciones obtuvimos aproximadamente 40 µg de ARN total.

Realizamos la síntesis del ADN copia a partir de ARN total o, en algunas ocasiones, a partir de ARN mensajero y en todos los casos utilizamos como iniciador un oligonucleótido poli-dT. Como control positivo - en las primeras amplificaciones por PCR realizadas - probamos oligonucleótidos cebadores

específicos para aldolasa, una enzima presente en todos los tipos celulares. En todos los casos obtuvimos un fragmento del tamaño esperado (Figura 10A). Para la amplificación de ADN específico para la DNasa I, a partir de las preparaciones de células BEL y epitelio cristalineano, utilizamos los oligonucleótidos A1 y Z1 (descritos en Materiales y Métodos), los que permitirían la amplificación de toda la región codificante del mensajero, incluyendo el péptido señal. Como resultado de la amplificación obtuvimos dos fragmentos mayoritarios de 900 y 800 pares de bases en aproximadamente la misma proporción y otros dos fragmentos más pequeños, presentes en mucha menor cantidad (Figura 10B). Los fragmentos mayoritarios presentaban tamaños idénticos en ambos tipos celulares, ya que al mezclar los productos de amplificación de ambas muestras obtuvimos las mismas dos bandas, sin ningún tipo de diferencia en movilidad relativa.

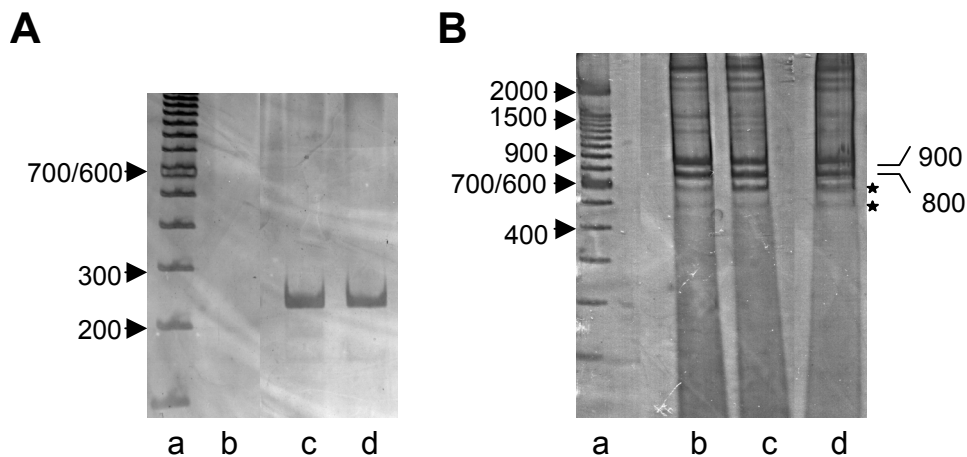


Figura 10. RT-PCR a partir de muestras de células BEL y epitelio cristalineano. A. Control con oligonucleótidos específicos para aldolasa, a. marcadores de tamaño, b. control negativo sin oligonucleótidos, c. células BEL, d. epitelio cristalineano. B. Amplificaciones con oligonucleótidos específicos para DNasa I, a. marcadores de tamaño, b. células BEL, c. epitelio cristalineano, d. células BEL junto con epitelio cristalineano. Electroforesis en gel de poliacrilamida 6% en TBE coloreado con nitrato de plata.

La región comprendida entre los oligonucleótidos A1 y Z1 en el ARN mensajero de la DNasa I pancreática es de 900 pares de bases. En las amplificaciones realizadas con ambos oligonucleótidos tanto en muestras de células BEL como de epitelio cristalineano, obteníamos un fragmento de ese tamaño. Para determinar la identidad de dicho fragmento de amplificación, lo secuenciamos. El ADN obtenido por RT-PCR fue resuelto por electroforesis en geles de agarosa de bajo punto de fusión, de manera de poder extraerlo de la banda. El ADN extraído fue concentrado por precipitación alcohólica y finalmente resuspendido en agua ultrapura. La secuencia fue realizada utilizando los oligonucleótidos A1, A2, Z1 y Z2 utilizando un protocolo de ciclado a baja temperatura.

1.1. Secuenciación y análisis del fragmento de 900 pares de bases obtenido a partir de células BEL

La comparación de la secuencia del fragmento de 900 pbs de células BEL con la del ARN mensajero de la DNasa I pancreática bovina (Genbank AJ001538) mostró que prácticamente ambas eran idénticas. Las diferencias existentes, tres nucleótidos que no pudieron ser determinados en nuestra secuencia, podían ser atribuibles a errores en el proceso de amplificación y/o secuenciación (Figura 11).

Nuestra conclusión fue, por lo tanto, que el mensajero de la DNasa I estaba presente en células BEL. Enviamos la secuencia nucleotídica del fragmento de 900 pares de bases a Genbank, donde le fue asignado el número de acceso AF311922.

También secuenciamos parte del fragmento de 900 pbs obtenido a partir de células del epitelio cristalino (Figura 12). Dicha región presentó una completa identidad con la secuencia de la región 3' del mensajero de la enzima pancreática. Este resultado permitió concluir que los ARN mensajeros para la DNasa I también estarían presentes en células epiteliales del cristalino *in vivo*.

1.2. Secuenciación y análisis del fragmento de 800 pares de bases obtenido a partir de células BEL

La presencia de un fragmento de amplificación de 800 pares de bases en células del epitelio cristalino tanto *in vitro* como *in vivo*, llamó nuestra atención. Nos pareció importante determinar si dicho fragmento era una forma de "splicing" alternativo o si estábamos frente a un producto de amplificación no específico. Para decidir entre estas dos alternativas lo secuenciamos. La alineación de su secuencia con la del mensajero de DNasa I pancreática (Figura 13) mostró que el fragmento de 800 pbs representaba una forma de "splicing" alternativo en la cual se habían perdido 116 nucleótidos de la región central. La secuencia génica de esta proteína no se conocía, pero, la comparación de la secuencia obtenida con las secuencias exónicas de ratón y humano, sugería que la región faltante corresponde al exón 5.

La traducción de la secuencia del fragmento de 800 pbs fue realizada utilizando la herramienta "TRANSLATE", disponible en el servidor *ExPASy*. La traducción del fragmento en el marco de lectura correcto (a partir de la tercera posición) mostró un codón **tga**, uno de los posibles codones de terminación, en la posición 339-341 (Figura 14).

Por lo tanto, en el caso que este ARN mensajero fuese traducido, generaría un polipéptido de solo 112 aminoácidos, en el cual solo los primeros 94 aminoácidos corresponderían a la DNasa I. Este polipéptido carecería de los aminoácidos clave del sitio activo, Glu 100, His 156, Asp 234 e His 274, así como de aquellos fundamentales para la unión del calcio Asp 99 y 107, Phe 109 y Glu 112 y la mayoría de los involucrados en la unión al ADN, Tyr 98, Arg 133, Asn 192, Tyr 197 y 233, y por esta razón no sería funcional. La secuencia fue enviada a Genbank, donde tiene el número de acceso AF528510.

Páncreas	151	ctc gcc ctc gct ggt ctg ctg cag ctg ggc ttg tcc ctg aag ata gca gcc ttc
	11	L A L A G L L Q L G L S L K I A A F
Cristalino	1	ctc gcc ctc gct ggt ctg ctg cag ctg ggc ttg tcc ctg aag ata gca gcc ttc
Páncreas	205	aac atc cgc acc ttt ggg gag acc aag atg tcc aat gct acg ctc gcc agc tac
	29	N I R T F G E T K M S N A T L A S Y
Cristalino	55	aac atc cgc acc ttt ggg gag acc aag atg tcc aat gct acg ctc gcc agc tac
Páncreas	259	att gtt cgg atc gtg cgt cgt tac gac atc gtc ctc atc cag gag gtc aga gac
	47	I V R I V R R Y D I V L I Q E V R D
Cristalino	109	att gtt cgg atc gtg cgt cgt tac gac atc gtc ctc atc cag gag gtc aga gac
Páncreas	313	agc cac ctg gtg gct gtg ggg aag ctc ctg gac tat ctc aac cag gat gac cca
	65	S H L V A V G K L L D Y L N Q D D P
Cristalino	163	agc cac ctg gtg gct gtg ggg aag ctc ctg gac tat ctc aac cag gat gac cca
Páncreas	367	aac acc tac cac tat gtg gtc agt gag ccg ctg ggc cgc aac agc tac aag gag
	83	N T Y H Y V V S E P L G R N S Y K E
Cristalino	217	aac acc tac cac tat gtg gtc agt gag ccg ctg ggc cgc aac agc tac aag gag
Páncreas	421	cgc tac ctc ttt ctg ttc aga ccc aac aag gtg tcc gtg ctg gac acc tac cag
	101	R Y L F L F R P N K V S V L D T Y Q
Cristalino	271	cgc tac ctc ttt ctg ttc aga ccc aac aag gtg tcc gtg ctg gac acc tac cag
Páncreas	475	tac gac gac ggc tgc gag tcc tgc ggg aac gac agc ttc agc cgg gag ccc gct
	119	Y D D G C E S C G N D S F S R E P A
Cristalino	325	tac gac gac ggc tgc gag tcc tgc ggg aac gac agc ttc agc cgg gag ccc gct
Páncreas	529	gtg gtc aag ttc tca tcc cac tcc acc aag gtc aag gaa ttt gcc att gtt gcc
	137	V V K X S H S T K V K E F A I V A
Cristalino	379	gtg gtc aag tnc tca tcc cac tcc acc aag gtc aag gaa ttt gcc att gtt gcc
Páncreas	583	ctg cac tcg gcc cca tcg gac gca gtg gct gag att aat tct ctc tac gat gtc
	155	L H S A P S D A V A E I N S L Y D V
Cristalino	433	ctg cac tcg gcc cca tcg gac gca gtg gct gag att aat tct ctc tac gat gtc
Páncreas	637	tac ctg gat gtc cag cag aag tgg cac ttg aac gat gtc atg ttg atg ggc gat
	173	Y L D V Q Q K W H L N D V M L M G D
Cristalino	487	tac ctg gat gtc cag cag aag tgg cac ttg aac gat gtc atg ttg atg ggc gat
Páncreas	691	ttc aat gct gac tgc agc tac gtg acc tcc tcg cag tgg tca tcc atc cgc ctg
	191	F N A D C S Y V T S S Q W S S I R L
Cristalino	541	ttc aat gct gac tgc agc tac gtg acc tcc tcg cag tgg tca tcc atc cgc ctg
Páncreas	745	cgt acg agc tcc acc ttc cag tgg ctg att cct gac agt gcc gac acc acg gct
	209	R T S S T F Q W L I P D S A D T T A
Cristalino	595	cgt acg agc tcc acc ttc cag tgg ctg att cct gac agt gcc gac acc acg gct
Páncreas	799	acg tcc acg aac tgc gcc tat gac agg atc gtg gtc gca ggg tct ctg ctc cag
	227	T S T N C A Y D R I V V A G S L L Q
Cristalino	649	acg tcc acg aac tgc gcc tat gac agg atc gtg gtc gca ggg tct ctg ctc cag
Páncreas	853	agt tct gtg gtt cct ggc tcg gcc gct ccc ttt gac ttc caa gct gca tac gga
	245	S S V V P G S A A P F D F Q A A Y G
Cristalino	703	agt tct gtg gtt cct ggc tcg gcc gct ccc ttt gac ttc caa gct gca tac gga
Páncreas	907	ctg agc aat gag atg gcc ctg gcc atc agt gac cat tac ccg gtg gag gtg acg
	263	L S N E M A L A I S D H Y P V E V T
Cristalino	757	ctg agc aat gag atg gcc ctg gcc atc agt gac cat tac ccg gtg gag gtg acg
Páncreas	961	ctg aca taa
	281	L T
Cristalino	811	ctn aca tna

Figura 11. Alineamiento de las secuencias del ARN mensajero de DNasa I de páncreas y del fragmento de 900 pbs de células BEL. Se muestran los aminoácidos codificados por cada codón. En amarillo se destaca la región correspondiente al péptido señal y en azul el codón de terminación de la traducción.

1	gtg	gtc	gca	ggg	tct	ctg	ctc	cag	agt	tct	gtg	gtt
49	gct	ccc	ttt	gac	ttc	caa	gct	gca	tac	gga	ctg	agc
97	ctg	gcc	atc	agt	gac	cat	tac	ccg	gtg	gag	gt	

Figura 12. Secuencia nucleotídica parcial del fragmento de 900 pbs de células epiteliales del cristalino. Esta región corresponde a los nucleótidos 829 a 956 del mensajero de la DNasa I pancreática.

Páncreas	158	tc gct ggt ctg ctg cag ctg ggc ttg tcc ctg aag ata gca gcc ttc aac
Cristalino	1	tc gct ggt ctg ctg cag ctg ggc ttg tcc ctg aag ata gca gcc ttc aac
Páncreas	208	atc ogc acc ttt ggg gag acc aag atg tcc aat gct acg ctc gcc agc tac
Cristalino	51	atc ogc acc ttt ggg gag acc aag atg tcc aat gct acg ctc gcc agc tac
Páncreas	259	att gtt ogg atc gtg cgt cgt tac gac atc gtc ctc atc cag gag gtc aga
Cristalino	102	att gtt ogg atc gtg cgt cgt tac gac atc gtc ctc atc cag gag gtc aga
Páncreas	310	gac agc cac ctg gtg gct gtg ggg aag ctc ctg gac tat ctc aac cag gat
Cristalino	153	gac agc cac ctg gtg gct gtg ggg aag ctc ctg gac tat ctc aac cag gat
Páncreas	361	gac cca aac acc tac cac tat gtg gtc agt gag ccg ctg ggc ogc aac agc
Cristalino	204	gac cca aac acc tac cac tat gtg gtc agt gag ccg ctg ggc ogc aac agc
Páncreas	412	tac aag gag ogc tac ctc ttt ctg ttc aga ccc aac aag gtg tcc gtg ctg
Cristalino	255	tac aag gag ogc tac ctc ttt ctg ttc aga --- --- --- --- --- --- ---
Páncreas	463	gac acc tac cag tac gac gac ggc tgc gag tcc tgc ggg aac gac agc ttc
Cristalino		--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
Páncreas	514	agc ogg gag ccc gct gtg gtc aag ttc tca tcc cac tcc acc aag gtc aag
Cristalino	285	--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- -g gtc aag
Páncreas	565	gaa ttt gcc att gtt gcc ctg cac tog gcc cca tog gac gca gtg gct gag
Cristalino	292	gaa ttt gcc att gtt gcc ctg cac tog gcc cca tog gac gca gtg gct gag
Páncreas	616	att aat tct ctc tac gat gtc tac ctg gat gtc cag cag aag tgg cac ttg
Cristalino	343	att aat tct ctc tac gat gtc tac ctg gat gtc cag cag aag tgg cac ttg
Páncreas	667	aac gat gtc atg ttg atg ggc gat ttc aat gct gac tgc agc tac gtg acc
Cristalino	394	aac gat gtc atg ttg atg ggc gat ttc aat gct gac tgc agc tac gtg acc
Páncreas	718	tcc tog cag tgg tca tcc atc ogc ctg cgt acg agc tcc acc ttc cag tgg
Cristalino	445	tcc tog cag tgg tca tcc atc ogc ctg cgt acg agc tcc acc ttc cag tgg
Páncreas	769	ctg att cct gac agt gcc gac acc acg gct acg tcc acg aac tgc gcc tat
Cristalino	496	ctg att cct gac agt gcc gac acc acg gct acg tcc acg aac tgc gcc tat
Páncreas	820	gac agg atc gtg gtc gca ggg tct ctg ctc cag agt tct gtg gtt cct ggc
Cristalino	547	gac agg atc gtg gtc gca ggg tct ctg ctc cag agt tct gtg gtt cct ggc
Páncreas	871	tog gcc gct ccc ttt gac ttc caa gct gca tac gga ctg agc aat gag atg
Cristalino	598	tog gcc gct ccc ttt gac ttc caa gct gca tac gga ctg agc aat gag atg
Páncreas	922	gcc ctg gcc atc agt gac cat tac ccg gtg gag gtg acg ctg aca taa
Cristalino	648	gcc ctg gcc atc agt gac cat tac ccg gtg gag gtg acg ctg aca taa

Figura 13. Alinamiento de las secuencias del fragmento de 800 pbs de células BEL y el ARNm mensajero de DNasa I de páncreas. En amarillo se destaca la región correspondiente al péptido señal y en azul el codón de terminación de la traducción.

1	tc	gct	ggt	ctg	ctg	cag	ctg	ggc	ttg	tcc	ctg	aag	ata	gca	gcc	ttc	aac	atc	
		A	G	L	L	Q	L	G	L	S	L	K	I	A	A	F	N	I	
54	cgc	acc	ttt	ggg	gag	acc	aag	atg	tcc	aat	gct	acg	ctc	gcc	agc	tac	att		
		R	T	F	G	E	T	K	M	S	N	A	T	L	A	S	Y	I	
105	gtt	cgg	atc	gtg	cgt	cgt	tac	gac	atc	gtc	ctc	atc	cag	gag	gtc	aga	gac		
		V	R	I	V	R	R	Y	D	I	V	L	I	Q	E	V	R	D	
156	agc	cac	ctg	gtg	gct	gtg	ggg	aag	ctc	ctg	gac	tat	ctc	aac	cag	gat	gac		
		S	H	L	V	A	V	G	K	L	L	D	Y	L	N	Q	D	D	
207	cca	aac	acc	tac	cac	tat	qtq	qtc	aqt	qaq	ccq	ctq	qqc	cqc	aac	aqc	tac		
		P	N	T	Y	H	Y	V	V	S	E	P	L	G	R	N	S	Y	
258	aag	gag	cgc	tac	ctc	ttt	ctg	ttc	aga	ggc	caa	gga	att	tgc	cat	tgt	tgc		
		K	E	R	Y	L	F	L	F	R		G	Q	G	I	C	H	C	C
309	cct	gca	ctc	ggc	ccc	atc	gga	cgc	agt	ggc	tga								
		P	A	L	G	P	I	G	R	S	G	STOP							

Figura 14. Traducción del fragmento de 800 pbs. En azul se destacan los aminoácidos correspondientes a DNasa I.

No realizamos experimentos para analizar si este transcripto era traducido, pero en ninguno de los Western-blots realizados con anticuerpos policlonales anti-DNasa I detectamos una banda más pequeña que la correspondiente a la proteína entera. Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que este mensajero sea traducido y no podamos detectar la proteína porque esté en muy baja concentración, o porque los anticuerpos que utilizamos no la reconozcan.

2. Secuenciación y análisis del gen de la DNasa I bovina

A pesar de que la DNasa I bovina es una de las nucleasas mejor conocidas, y de las más usadas como herramienta en múltiples procedimientos de biología molecular, se desconocía la organización de su gen. Por lo tanto nos pareció importante abordar el estudio del gen en bovinos, lo que además nos permitiría identificar correctamente la región faltante en el fragmento de 800 pares de bases y explicar la aparición del codón de terminación tga en la posición ya descrita.

Usamos ADN de timo bovino de origen comercial. Los oligonucleótidos utilizados fueron A1 y Z1 y otros internos diseñados utilizando como base la secuencia del ARN mensajero. La selección de dichos oligonucleótidos fue realizada de forma tal de partir el gen en dos fragmentos solapantes (Figura 15).

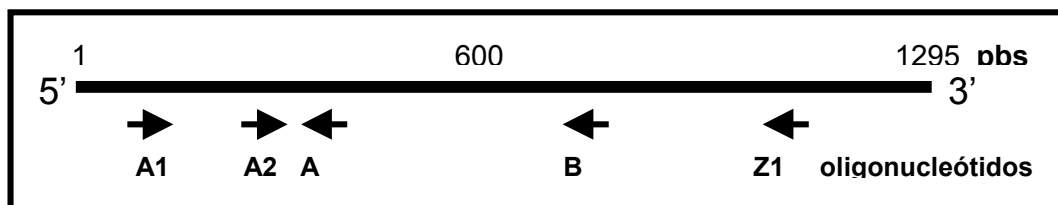


Figura 15. Representación esquemática de la posición de los oligonucleótidos utilizados para la secuenciación del gen de la DNasa I bovina sobre el ARN mensajero. Las flechas indican la orientación del oligonucleótido.

Con la pareja de oligonucleótidos A1/A obtuvimos un fragmento mayoritario de 800-900 pares de bases y uno minoritario de 2000 pares de bases (Figura 16, carril c). Con los oligonucleótidos A2 y Z1 el único fragmento de amplificación obtenido fue de 1500 pares de bases (Figura 16, carril d).

Los productos de amplificación fueron separados en geles de agarosa de bajo punto de fusión y el ADN extraído de la banda fue secuenciado. El resultado de las respectivas secuencias nucleotídicas y su comparación con la secuencia del mensajero nos permitieron ensamblar las regiones génicas que se muestran en la figura 17.

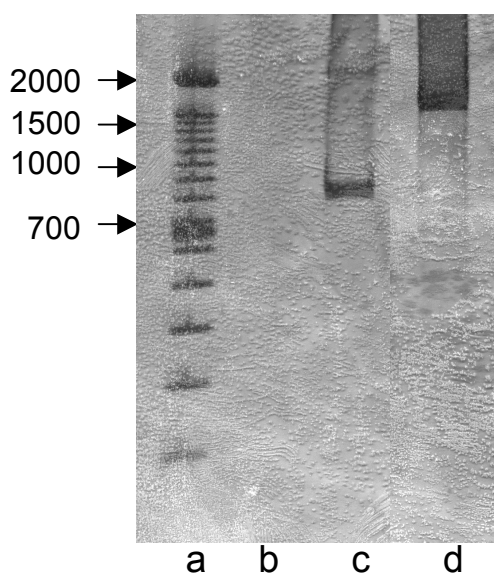


Figura 16. PCR de los fragmentos amplificados a partir de ADN genómico. a. marcadores de tamaño, b. control negativo sin oligonucleótidos, c. oligonucleótidos A1/A, d. oligo-nucleótidos A2/Z1. Las puntas de flecha señalan las bandas que fueron secuenciadas. Electroforesis en gel de poliacrilamida 6% en TBE colo-reada con nitrato de plata.

La asignación de identidad de cada exón fue realizada mediante la comparación con las secuencias génicas de la DNasa I de humano, rata y ratón. La secuencia génica bovina así como la ubicación de cada exón e intrón fue enviada a Genbank y recibió el número de acceso AF528509.

ATG AGG GGC ACC AGG CTG ATG GGG CTG CTG CTC GCC CTC GCT GGT CTG CTG	51
M R G T R L M G L L L A L A G L L	17
CAG CTG GGC TTG TCC CTG AAG ATA GCA GCC TTC AAC ATC CGC ACC TTT GGG	102
Q L G L S L K I A A F N I R T F G	34
(EXON 2)	
GAG ACC AAG ATG TCC AAT GCT ACG CTC GCC AGC TAC ATT GTT CGG gtaggtc	154
E T K M S N A T L A S Y I V R	49
cagatctgtccccagggccctcaggggtggggaagctggaagtgggcatctaacaggccctggaat	221
cctgggcccgtgggtcagtcctgaggggtgactggcagcgggtggaatggggggcatcaagggtctcag	288
cccacctgtcagtcagggggacgagcccttggtattgccatgctgttcatggctggtattaggggtcc	355
caggctaggctgtgacagggagtgtccgggtgggggcagcagctcagccccgggacccacagcagg	422

caggctcggaacacatgggtctccgcctgctgctcagcaacattctggccttgtccccag ATC 486
 I 50

GTG CGT CGT TAC GAC ATC GTC CTC ATC CAG GAG GTC AGA GAC AGC CAC CTG 537
 V R R Y D I V L I Q E V R D S H L 67
 (EXON 3)

GTG GCT GTG GGG AAG CTC CTG GAC TAT CTC AAC CA gtgggtgaagtgggggtccc 591
 V A V G K L L D Y L N Q 79

aggaggccggggggggcggggagggggacgatggcaactgtctcttcccgggcacgggtgccagggtca 658

gcctggccgtagggacacaggtgttgggtaggtccctggaacttgcctaccaccaacttctgactg 725

ggacctttgtctcctcaatccag G GAT GAC CCA AAC ACC TAC CAC TAT GTG GTC 779
 D D P N T Y H Y V V 89

AGT GAG CCG CTG GGC CGC AAC AGC TAC AAG GAG CGC TAC CTC TTT CTG TTC 830
 S E P L G R N S Y K E R Y L F L F 106
 (EXON 4)

AG gtaacattgcaggcttccgcctcacgagcacacgggaggctgcaatgtcgcctagagcccggtg 895
 R 107

ggccctcccctcaggtttgagggcaagaactggggcccccagagcaggggtctgagctgggctgtgc 962

cccttgaggcctcagcccagcagaggcaggccttggtgggagctctgtgccagtgggtctgcg 1029

tgggtgtctgagcccaggtgaccaccctccggcctggccttctgcag A CCC AAC AAG GTG 1089
 P N K V 111

TCC GTG CTG GAC ACC TAC CAG TAC GAC GAC GGC TGC GAG TCC TGC GGG AAC 1140
 S V L D T Y Q Y D D G C E S C G N 128
 (EXON 5)

GAC AGC TTC AGC CGG GAG CCC GCT GTG GTC AAG TTC TCA TCC CAC TCC ACC 1191
 D S F S R E P A V V K F S S H S T 145

AAG gtgagtcgccccaccccgacacgctgggtcttgtgctgcacccacagccccttgggtcttac 1257
 K 146

actgaagttagttagaagacgtccacacttgggggtgtctcagttgtcctctaccccagccaaca 1324

tccactctgctgtctccaccaag GTC AAG GAA TTT GCC ATT GTT GCC CTG CAC TCG 1380
 V K E F A I V A L H S 157

GCC CCA TCG GAC GCA GTG GCT GAG ATT AAT TCT CTC TAC GAT GTC TAC CTG 1431
 A P S D A V A E I N S L Y D V Y L 174
 (EXON 6)

GAT GTC CAG CAG AAG TGG CAC TTG AAC gtgagccctccccgctgccccgccttgggc 1489
 D V Q Q K W H L N 183

tctgggggcctccatcgctgcacgtgcoctgggccaacccatggctgtctcctggcag GAT GTC 1553
 D V 185

ATG TTG ATG GGC GAT TTC AAT GCT GAC TGC AGC TAC GTG ACC TCC TCG CAG 1604
 M L M G D F N A D C S Y V T S S Q 202
 (EXON 7)

TGG TCA TCC ATC CGC CTG CGT ACG AGC TCC ACC TTC CAG TGG GTG ATT CCT 1655
 W S S I R L R T S S T F Q W L I P 219

GAC AGT GCC GAC ACC ACG GCT ACG TCC ACG AAC TGC GCC TAT GAC AG gtg 1705
 D S A D T T A T S T N C A Y D R 235

aagcggggtgcctctgcgactagcttcaaaagtgttttccaagaccgnacactcacccctcctgact 1772

taggaaaaggcatttcttagttttgggttgagcacatttagggagaatacgacactggcagataat 1839

ggaggttgggtcagcggtgtgcagtttggggcaacattgagccggggcccaaccaactccacagtggc 1906
 atttaagcgtggttgggtgtgtgtgacaagtgcagattgtcacacctggggtcttgtgtctgctac 1973

tgtag G ATC GTG GTC GCA GGG TCT CTG CTC CAG AGT TCT GTG GTT CCT 2021
 I V V A G S L L Q S S V V P 249
 (EXÓN 8)


```

GGC TCG GCC GCT CCC TTT GAC TTC CAA GCT GCA TAC GGA CTG AGC AAT GAG 2072
G   S   A   A   P   F   D   F   Q   A   A   Y   G   L   S   N   E   266

ATG gtaagtatcttttctggaacacactgcttttttgttgacttgagaaaaccaatggctctgggc 2138
M                                     267

cagtcctgacccacctcaggcgcacgaccatagacgactaggtgtctgtgggtccctgcgctcactgc 2205

tgtcttccacag   GCC CTG GCC ATC AGT GAC CAT TAC CCG GTG GAG GTG ACG 2257
                A   L   A   I   S   D   H   Y   P   V   E   V   T   280
                (EXON 9)

CTG ACA TAA GTCCCTTCG                                     2275
L   T                                                         282

```

Figura 17. Estructura del gen de la DNasa I bovina. Las regiones nucleotídicas correspondientes a los exones se indican en mayúscula y en minúscula los intrones, la región codificante para el péptido señal está subrayada. Al inicio y final de cada intrón aparecen subrayados los gt y ag correspondientes. Se muestra el aminoácido codificado por cada codón y en la secuencia aminoacídica se resalta en amarillo la región correspondiente al péptido señal.

En la región codificante, el gen está formado por ocho regiones exónicas, cuyos tamaños varían entre 48 y 155 pares de bases y siete regiones intrónicas, cuyos tamaños varían entre 89 y 336 pares de bases (Tabla VIII).

Tabla VIII. Tamaño de las regiones exónicas e intrónicas del gen de la DNasa I bovina.

	1	2	3	4	5	6	7	8
Región exónica	147	89	84	118	111	155	97	48*
Región intrónica	336	176	244	153	89	276	143	

* región codificante

El análisis de la secuencia obtenida junto con su comparación con la secuencia del ARN mensajero correspondiente, nos permitió determinar que durante el proceso de “splicing” que dio lugar al fragmento de 800 pares de bases, se retuvo el primer nucleótido del exón 5 (adenina) y el último nucleótido del intrón 5 (guanina). Esto explicaría los resultados obtenidos al traducir el fragmento de 800 pares de bases.

El análisis del alineamiento de los cuatro genes: bovino, humano, rata y ratón (Figura 18), nos permitió determinar que el tamaño de los exones estaba muy conservado entre estas especies ya que las diferencias eran del orden de dos pares de bases (Tabla IX). En cambio, en el caso de los intrones las diferencias de tamaño eran muy importantes, llegando a ser de más de 100 pares de bases en el caso de los intrones 4 y 7 de humano respecto a los de las otras tres especies (Tabla X).

RATON	GCTTCACTGCTTCTTTGTCTGACCATTCA---ATCTCACAGGATGCGGGTACACAGGGC	210
RATA	GGTTCACTGCTTCTTTGTCTGACCCTCACTCCATCTCACAGGATGAGGTACACAGGGC	265
BOVINO	-----ATGAGGGGCACCAGGC	16
HUMANO	GTCTCACTTCTGTTATGTCTGTGCCCTGTGC--TCTCCAGGATGAGGGGCATGAAGC	1436
	*** ** *	
RATON	TAATGGGAACACTGCTCACCTTGGTCAACCTGCTGCAGTTGGCTGGGACTCTGAGAATTG	270
RATA	TGATGGGAATACTGCTCACCTTGGTCAACCTGCTGCAGTTGGCTGGGACTCTGAGAATTG	325
BOVINO	TGATGGGGCTGCTGCTCGCCCTCGCTGGTCTGCTGCAGCTGGGCTTGTCCCTGAAGATAG	76
HUMANO	TGCTGGGGGCGCTGCTGGCACTGGCGGCCCTACTGCAGGGGGCCGTGTCCCTGAAGATCG	1496
	* **** * * *	
RATON	CAGCCTTCAACATTCGGACTTTTGGGGAGACTAAGATGTCCAATGCTACCCTCTCTGTAT	330
RATA	CAGCCTTCAACATCCGGACTTTTGGGGATACTAAGATGTCTAATGCCACCCTCTCTAGCT	385
BOVINO	CAGCCTTCAACATCCGCACCTTTTGGGGAGACCAAGATGTCCAATGCTACGCTCGCCAGCT	136
HUMANO	CAGCCTTCAACATCCAGACATTTGGGGAGACCAAGATGTCCAATGCCACCCTCTGTAGCT	1556
	***** * ** ***** ** ***** * * *	
RATON	ACTTTGTGAAAGTAAGT-CAC-TGTGGCCAGAG---TCTGAGAGCAGGCGTGCTATCAGG	385
RATA	ACATTGTGAAAGTAAGTTCAG-GGTGGCCCAAG---TCTGAGAGCAGACATGTGGTCAGG	441
BOVINO	ACATTGTTCGGGTAGGTCCAGATCTGTCCCCAGGGCCCTCAGGGTGGGGAAGCTGGAAGT	196
HUMANO	ACATTGTGCAGGTGAGGCCAG-GGCAGCCTCCC---CCCAAAGCAGAGGAGCTCTGGAG	1612
	** **** ** * ** *	
RATON	GA---AGCTAG-----AGACCACAGT-GAACCTGAGGCCTTACCATAGCTGG--	428
RATA	GG---AGGTAGTGGCTGTCTTAAACCACAGT-GAAGCTGAGGCCTTACCATACCTGG--	495
BOVINO	GGGCCATCTAACAGGCCCTGGGAATCCTGGGCCGGTGGTCAGTCCCTGAGGGTGACTGGCA	256
HUMANO	TCTAGGGCTGGTGGGCA-----GGGCCAGCCC---TATGAGCCACAGGGTGTCTGGGTG	1663
	* ** * * *	
RATON	-----GTGGATGTGAGCCAGATTACGGTC-CACACCGTCCAT--GGCTGGC--AG	474
RATA	-----GTGGATGTGAGCCAGATTACTGTC-AACACTGTCCAC--GGCTGGC--AG	541
BOVINO	GCGGTGGTAAATGGGGGGGCATCAAGGTCTCAGCC-CAC-CTGTGAGTCAGGGGGAC--GA	312
HUMANO	TGGGGTACTGAGCACCACTGCTCCAGCACGGTGAACAGGCTCTTGGCTGTGGACCAAG	1723
	* * ** ** *	
RATON	G-----A-----GAGCTGT--GTGGAAGGAA---GAGCAGCAGCTGCAGCTCTGGCT	516
RATA	GTATCTGACA-----AGAGTGT--AAGCTTGAGA---GAGCTGTGCGTTAAGAGTGGCA	591
BOVINO	GCCCTTGT'TATTGCCATGTGTTCATGGCTGGTATTAGGGTCCCAGGCTAGGCTGTGACA	372
HUMANO	GTCCTCATCCCTGTGTGTGTCTCTGGCTGGCA--GCAGGAGCCAGGCAGAAACATGA	1781
	* *** * *	
RATON	CTCTGAGGTTC--TGGGAGGGACAA-----AGTTCTGAGGTATT--GAGCTGCTGA	564
RATA	G-CTGCGGCTC---AGGCTCTCTGA-----AGTTCTGAGGCCCT--GAGCTGCTGG	636
BOVINO	GGGAGTGTCCGGGTGGGGGCAGCAGC-----TCAGCCCCGGGACCA--CAGCAGGCAG	425
HUMANO	GGCTGCGGTTAAACCGAGCAATGCCACGAGCATCAGCTGTGGCTCCCTTTGTGGCTGTG	1841
	* * * ** *	
RATON	TCCAGCCCTGCCTA---CCCAGCCTGT-----TACCCGCAGAT	599
RATA	TCCAGCTCTGCCCC---CCCAGCCTGTCTTGCTCA-GCTGTGTGGCCCTGTCCAGCAT	692
BOVINO	GCTCGGAACACATGGGTCTCCGCCTGCCTGCTCAGCAACATTCTGGCCTGTCTCCCAT	485
HUMANO	AGGGTCCCTGGGTGGCACCAGCCCTGCTCAGT---ACCACTGTGGCCCTGCCCCCAGAT	1897
	* **** * * *****	
RATON	CCTGAGTCGCTATGACATCGCTGTTATCCAAGAGGTCAGAGACTCCACCTGGTTGCTGT	659
RATA	CCTGAGTCGCTATGACATTGCTGTGGTCCAAGAGGTCAGAGACTCACCTGGTTGCTGT	752
BOVINO	CGTGCGTCTGTACGACATCGTCTCATCCAGGAGGTCAGAGACAGCCACCTGGTGGCTGT	545
HUMANO	CCTGAGCCGCTATGACATCGCCCTGGTCCAGGAGGTCAGAGACAGCCACCTGACTGCCGT	1957
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
RATON	TGGGAAGCTCCTGGATGAACTCAATCGGTGGGTGACAGTA-----CTGGAGTCCTAGAG	713
RATA	TGGGAAGCTACTGGATGAACTCAATCGGTGGGTGACAGTG-----CTGGAGTCCTAGAA	806
BOVINO	GGGGAAGCTCCTGGACTATCTCAACCAAGGGTGA-AGTGGGGTCCAGGAGGCCGGGG	604
HUMANO	GGGGAAGCTGCTGGACAACCTCAATCAAGTGGGTGACAGTG-----GCAGGGTCATAGGA	2011
	***** * * * * * * * * * * * * * *	
RATON	TA-----TAATGACAAC-CATTTAC-----AGTCTACGCCCCTCTGTGCTCT	754
RATA	TG-----TAATGACAAC-CATTTAC-----AGTCTACTCCCTCTGTGCTCC	847
BOVINO	GGGCGGGGAGGGGACGATGGCAAC-TGTCTCTCCGGGCACGGTGCCAGGTGACGCTG	663
HUMANO	AG-----GTGACATCTCGTCCACGGCACAGCCTCACTTCACTTGGGCCCC	2056
	* * * * *	

RATON	ATTGTTGGAG-----CCCTGCTATCAGATG---CCAGGAGGCTCCCTCTATG	798
RATA	ATTGATGGAG-----CCTTGATATCAGGGG---CCAGGAGGCTCCCTGTCTG	891
BOVINO	GCCGTAGGGA-----CACAGGTGTGGGTAGGTCCCTGGAACCTTGCCCTACCA	711
HUMANO	AAGGGTGGGGACCTGGGCACTGCCTCGCTATCGGCAG---CCAGAGGGGTCCCC-TATG	2111
	* * * * *	
RATON	GTGA-----AAAAGTACCTTTGGTTTCCTTTATCCAGGGACAAACCTGACACCTACCGCT	853
RATA	GTGA-----AAAAGTACCTTTGGTTTCCTTTATCCAGGGACATCCCTGACAACTATCGCT	946
BOVINO	CCAACTTCTGACTGGGACCTTTGTCTCCTCAATCCAGGGATGACCCAAACACCTACCACT	771
HUMANO	GCCCCCGCACTGGGACCTTTTGTTCCTTCAATCCAGGGATGCACCAGACACCTATCACT	2171
	* * * * *	
RATON	ATGTAGTCAGTGAGCCGCTGGGCCGCAAAAGCTACAAGGAACAGTACCTTTTGTGTACA	913
RATA	ATATAATCAGTGAGCCGCTGGGCCGCAAAAGCTACAAGGAACAGTACCTTTTGTGTACA	1006
BOVINO	ATGTGGTCAGTGAGCCGCTGGGCCGCAACAGCTACAAGGAGCGCTACCTCTTCTGTTCAC	831
HUMANO	ACGTGGTGAGTGAGCCACTGGGACGGAACAGCTATAAGGAGCGCTACCTGTTCTGTGTACA	2231
	* * * * *	
RATON	GGTAAA-GCCCTATGCTGCCA--AAGCCT-----GAGAATA----AACT-C	951
RATA	GGTAAA-CCCCCACACTGTCA--AAGCCC-----AAGAACAC---AGCC-T	1045
BOVINO	GGTAAC-ATTGCAGGCTTCCG--CCTCAC-----GAGCACACGGGAGGCTGC	875
HUMANO	GTGGGTGGTCTAGAAAGCCAGGAAGCCCCCTCCCTCACCTGGGAGGGCCCCAACAGAG-C	2290
	*** * *	
RATON	AGGGATGTG--CAGGCCTCA-AAGCTGTGCCAAAG-----AGGATGAGAG--TG	995
RATA	GGGGACATA--CAGACCCCA-GACCTGTGCCACAG-----AGGCTGAGAG--AG	1089
BOVINO	AATGTCGCC--TAGAGCCCGTGGGCCCTCCCTCA-----GGTTTGGAGGCAAG	922
HUMANO	AGGGAAGTAGTTTGTCTATTAGTTGTCTATGGTAAGAACCTGAGGCTTCAGAGCAGG	2350
	* * * *	
RATON	GT-----TTGGAGGG-----CC-AGG-----	1010
RATA	GT-----TTGGAGAG-----CCCAGG-----	1105
BOVINO	AA-----CTGGGGCC-----CCAGA-----	938
HUMANO	GTCCATTTTGGAGTGAAAACACCCCAAGTCCCTGGACCAATGGGTGAGCAGGTGCCTGG	2410
	*** *	
RATON	-----TGACCCTCTTTACTTGGG---AGGTCCTTA--TAGAGTAGGGGTA-----	1051
RATA	-----CGACCCTCTTCCCTTGGG---AGGCCCTTA--CAGAGCAGGGGTA-----	1146
BOVINO	-----GCAGGGGTCTGAGCTGGGC---TGTGCCCT--TGAGGCCTCAGC-----	978
HUMANO	CTCCCCCGCCTCCTGTGCGCTGGGTCCCGACCAATGGGTGAGCAGGTGCCTGGCTCC	2470
	* * *	
RATON	-----GCAATGTATATTACAGGACTTCAGGATAAG-----GTTCT----	1086
RATA	-----GCAATGTGTATTA--AGAATAACAGGATAAG-----GCTCC----	1180
BOVINO	-----CCATGCAGAGGCAGGAGGCCTTGGTGGGA-----GCTCT----	1012
HUMANO	CCCGCCCTCCTGTGCGCTGGGTCCCGCACCAATGGGTGAGCAGGTGCCTGGCTCCCCCG	2530
	* * *	
RATON	-----GGCTGGG-TGGGTATCCATCTACTCAGGTAGC-----TCTCACA	1124
RATA	-----GGTTGGG-TGAA----CATCTACTTAGGCACC-----TCTCA-A	1213
BOVINO	-----GTGCCAG-TGGG-----TCTGCGTGGTGTCT-----GAGCCCA	1044
HUMANO	TCCTCCTGTGCGCTGGGACGGACGCTGCCTCCTGGGAAGCAGGAGTGGGGAGCTTCCA	2590
	* * *	
RATON	GCCCCAGA--GTCACCTCTTGTCTTGTCTTCTCTAGGCCTGACCAGGTGTCTATTCTGG	1182
RATA	GCCCCAG---TCACTTCTTGCCTGTCTTCTTTAGGCCAGCCAGGTGTCTGTTTGG	1269
BOVINO	GGCTGAC---CACCTCCGGCCTGGCCTTCTGCAGACCCAAACAAGGTGTCCGTGCTGG	1099
HUMANO	GCCTGGGGTCACCTCCTGCTGCCGCTTCCCGCAGGCCTGACCAGGTGTCTGCGGTGG	2650
	* * * * *	
RATON	ACAGCTATCAATATGATGATGGCTGTGAACCTGTGGAAATGACACCTTCAGCAGAGAGC	1242
RATA	ATAGCTATCATTATGACGATGGCTGTGAACCTGTGGAAATGACACCTTCAGCCGAGAGC	1329
BOVINO	ACACCTACCAGTACGACGACGGCTGCGAGTCTGCGGGAACGACAGCTTCAGCCGGGAGC	1159
HUMANO	ACAGCTACTACTACGATGATGGCTGCGAGCCCTGCGGGAACGACACCTTCAACCCGAGAGC	2710
	* * * * *	
RATON	CAGCCATTGTTAAGTTCTTTTCCCCATACACTGGTGAGTGCTACTGGGGCTTCACTGTCA	1302
RATA	CAGCCATTGTCAAGTTCTTTTCCCCATACACTGGTACGTGCTGTTGTGCTC---CTTCCA	1386
BOVINO	CCGCTGTGGTCAAGTTCTCATCCCACTCCACCAAGGTGAG---TGCG-----	1203
HUMANO	CAGCCATTGTGAGGTCTTCTCCCGTTCCAGGTGGGTGCTGCCTGG-----	2758
	* * * * *	
RATON	GCCCTGCCTAGGCCACGATGGAGTCACAGCTTACAACCTCCCATCCAGACCTCTAGAAGCC	1362
RATA	GCCCTGCTCAGGCCAAGATGGAGTCGACAGATTGCAGCTCACATCTAGATCTCTAGAAGCT	1446
BOVINO	---CCCACCCGGACACGCTGGTCTTGT-----	1228
HUMANO	-----GCCAGGGTGGGGCTCGGCTTATGGCCTCCACCCCTCCTAGGGAACT	2813
	* * * * *	

RATON	TGTGGCTGGCAGGGCTGCC-CCCACATT-CCCTCAGGGAACCTCCC-----	1405
RATA	GGTGGC---AGGGCTGCTGCCTACACT-CCCTCAGGGAGCTCCCTCGCCTTCAGCTCCC	1501
BOVINO	-----GCTGCACCCACAGC-CCCTTTGG---TCT-----	1254
HUMANO	GG-----AATGCCTGTGTACACACTGCCCTCCCAG---TCCCT-----	2849
	*** * *** **** **	
RATON	AGTGTCTCTGAATTTACATTCAA-CTACAAGGACAATATCTAG-CCTGTGGGAGACTGTCC	1463
RATA	AGTGGTCTGCATTAAACATTAC-TGACAAGGATAGTGTCT--CCTGTGGGAGACTGCCC	1557
BOVINO	--TACACTGAAGTTACTT-----AGGAAGACGTCCA--CACTTGGGGGGTGTCT	1299
HUMANO	GGGGCTTGGGTTTTCCATTCAAGTCATTTGGAAAATATCCACCCCGGGGGGACTGTCA	2909
	* * * * * *** ** * * * *	
RATON	CATATCTTACCTCTGC-TCGAAGCTAAA-ACCACTCTGCATAAGGGCCCCAGTGTAAAC	1521
RATA	CACATCTTTCATCTCTGCGCCACAGTTAAAGACGCCCTGCATAAGG-CCCCAGTGTGTCT	1616
BOVINO	CA---GTTGTCTCTAC-----CCCAG-----	1318
HUMANO	TGATACATAGTTCAGC-----TGACATGGTGACT	2939
	* * * **	
RATON	TCAGACCAGACCCAATCCAGGCTGGTCTCTGGACACCATGTCCATAGCATGTCTGCTTTT	1581
RATA	TCAGACCAGCCCCAACCTAGGCTGGCCTCTGGACACTATGTGATTGCGTGTCTGCTTCT	1676
BOVINO	-----CCAAC---ATCCA-----CTCTG-----CTG--TCT	1339
HUMANO	--GAACCTGCC---CCCAGGGAGTGTGCCTCACACGA-----CGTGGCTG--TCT	2982
	** * * *	
RATON	CCTCAGAGGTCCAAGAATTTGCGATCGTGCCTTGTCATGCAGCCCCAACAGAAGCTGTGA	1641
RATA	CCTTAGAGGTCCGAGAGTTTGGCATTGTGCGCCTTGCACTCAGCCCCAACAGAGGCTGTGA	1736
BOVINO	CCACCAAGGTCAAGGAATTTGCCATTGTTGCGCTGCACTCGGCCCATCGGACGCAGTTGG	1399
HUMANO	CCACAGAGGTGAGGAGTTTGCATTGTTCCCTGTCATGCGGCCCCGGGGGACGCAGTAG	3042
	** ***** ** ***** ** ** ***** * ***** ** * *	
RATON	GTGAGATCGACGCCCTCTACGATGTTTACCTAGATGTCTGGCAAAAGTGGGGCCTGGAGG	1701
RATA	GTGAGATCGATGCCCTCTACGATGTTTATCTAGATGTCCGGCAAAAGTGGGGCCTGGAGG	1796
BOVINO	CTGAGATTAATTCTCTCTACGATGTCTACCTGGATGTCCAGCAGAAGTGGCACTTGAACG	1459
HUMANO	CCGAGATCGACGCTCTCTATGACGCTACCTGGATGTCCAAGAGAAATGGGGCTTGGAGG	3102
	***** * * ***** ** * * * * * * * * * * * * * * * *	
RATON	TGAGACCATCCTAGGG-----ACAATGGGTCTATTGGCC-CTGTTTGT-----CCC	1747
RATA	TGAGACTATCCTAGGG-----ACAATGGGTCTCTTGGCC-CTGTTTGT-----CCC	1842
BOVINO	TGAGCCTCCCCGCTGCCCCCGCTTGGGCTCTGGGGGCC-TCCATCGTGCATCGTGCC	1518
HUMANO	TGAGGCCCTCCCAGGG-----GCAGTGGGACCAGCGCCTCCGCATGT-----CCC	3149
	**** * ** * * * * * * * * * * * * * * *	
RATON	TGGACCAAC--AGGCATGTCTGCTGGTAGGACATCATGTTTATGGGAGACTTCAATGCTG	1805
RATA	TGGACCAAC--AGGCATGTCTCCTGGTAGGACATCATGTTTATGGGAGATTTCATGCTG	1900
BOVINO	TGGGCCAACCCATGGCTGTCTCCTGGCAGGATGTCTGTTGATGGGCGATTTCATGCTG	1578
HUMANO	AGGGCCACA--GGCAGCGTTTCCTGGTAGGACGTATGTTGATGGGCGACTTCAATGCGG	3207
	* *	
RATON	GCTGCAGCTACGTCACTTCCCTCCCAGTGGTCCCTCCATTTCGCCTTCGGACAAGCCCCATCT	1865
RATA	GCTGCAGCTACGTCACTTCCCTCCCAGTGGTCCCTCCATTTCGCCTTCGGACAAGCCCCATCT	1960
BOVINO	ACTGCAGCTACGTGACCTCCTCGCAGTGGTATCCATCCGCTGCGTACGAGCTCCACCT	1638
HUMANO	GCTGCAGCTATGTGAGACCTTCCAGTGGTATCCATCCGCTTGTGGACAAGCCCCACCT	3267
	***** *	
RATON	TCCAGTGGCTGATCCCTGACAGTGGGACACCAAGCTCACATCAACACACTGTGCTTATG	1925
RATA	TCCAGTGGCTGATCCCTGACAGTGGGACACCAAGCTCACATCCACACACTGTGCTTATG	2020
BOVINO	TCCAGTGGGTGATTCCTGACAGTGGGACACCAAGCTACGTCCACGAAGTGGCCTATG	1698
HUMANO	TCCAGTGGCTGATCCCCGACAGCGCTGACACCAAGCTACACCCACGCACTGTGCTTATG	3327
	***** *	
RATON	ACAGGTGAGCAGC-CCCAAAGCCAAACCAAGCCTTCACTCGCCTTCTCCTACTCAAGAGG	1984
RATA	ACAGGCAAGCAGC-CCCAAAGC-AAACCAAGCCTTCACTTGCCTTTCCTGCTCAAGAGG	2078
BOVINO	ACAGGTGAAGCGG-GGTGCCTCTGCGACTAGCTTCAAAAGTGCTTTCCCAAGACCGNACA	1757
HUMANO	ACAGGTGAGCAGGGCTCGCGCTTAGGGCAGACTGAGGGCACCTCCAAGGGCAGCCGTGA	3387
	***** * * * * * * * * * *	
RATON	CAGG-AGCTCTCCTTCTTACAGACTCCTAGTTTTCTTGTGTCAGAGTGGC-TACCAGCAGGT	2042
RATA	CAGG-AGCTCTGGTCTTG-AGGCTCCTAGTTTTCTTGTGTCAGAGTGGC-TACCAGTGGAT	2135
BOVINO	CTCA-CCCTCCTGACTTAGGAAAAGGCATTTCTTAGTTTTGGGTTGGAGCACATTTAGGG	1816
HUMANO	CTCATAGGTCCGGCTTCAGAAGCCTCAAAGCCTTT-----GAACACT----CACCAAC	3437
	* ** * * ** *	
RATON	GGGGTTCCATCTGGGCAGCTTACATGTTAGTTTCTGCTA-GTGCAGGCCTTCTCTTCGGT	2101
RATA	GGGGTCCATCTGGGCACCTTACATGTC---CCTGCTA-CTGCAGGGTCCCTCTT-AGT	2189
BOVINO	AGAATACGACACTGGCAGATAATGGAGGTTGGTCAGCGGTGTGCACTTTGGGGCAACATT	1876
HUMANO	TGAGCTTCAGTTGATC-CACTACAGGGAACAGAATAACAAGAGCCACGATTTTTTA-GGT	3495
	* * * * * ** *	

RATON	ACTCCTGGGTGTAGCACATTT-----GGAGCCTGGGGTCAGCAAAC-TCTATGTGGGAA	2154
RATA	GGCCCTGGGTGGAGTACATT-----GGACCCTGGGGGAGCAGAG-CTTAACC--AA	2238
BOVINO	GAGCCGGGGCCCAACCAACTCCACAGTGGCATTTAAGCGTGGTTGGT-GTTGTGTGACAA	1935
HUMANO	TTTTTCGGATA-AGCACATCT---GGGGATAAGAGGAGGAGCAGACACCTAGGCTGTCA	3550
	** * * ** * * *	
RATON	A---GAGGAGAGGAACCTTCTTCTTTGATATCC----TACAGGATTGTGGTTGTCCGAG	2206
RATA	G---GACTCTACGTGTCTTTGCTGGATTCCCTT----TGAGGATTGTGGTTGTCTGGAG	2290
BOVINO	GTGCAGATTGTACACCCCTGGGCTCTTGTGTCTGCTACTGTAGGATCGTGGTTCGACAGGGT	1995
HUMANO	TG--TGGTTTCCACATTGAGGGGCACAGACCAGGGTG-TGCAGTTTGTG-GGCACCCACAG	3606
	* ** * * **	
RATON	CTCTGCTCCAG--GCTGCTGTTGTTCCCAACTCGGCTGTTCTTTTGATTTCCTAAGCAGA	2264
RATA	CTCTGCTCCAG--GCTGCTGTTGTTCCAGCTCGGCTGTCCCTTTGACTTCCAAGCAGA	2348
BOVINO	CTCTGCTCCAG--AGTTCTGTGGTTCTCTGGCTCGGCCGCTCCCTTTGACTTCCAAGCTGC	2053
HUMANO	ACCTGCACCTGGCAGGTCCCAGGGCTCTTAGTTTAGTT---CCTGCGGGTGTGAGCCAG	3662
	**** * * * * * * * * * * *	
RATON	ATACGGACTTTCCAACCAGCTGTATGTGTCTCTC---TCTTGTGTGGTTTAGGTTAG	2320
RATA	ATACAGACTTACCAACCAGATGTATGTGTCTCTTC---CTTCATGTGGTTTAGGTTAG	2404
BOVINO	ATACGGACTGAGCAATGAGATGTGAAGTATC-TTTC---CTGGACACACT---GCTTTT	2105
HUMANO	GCCCATGTGTGAAGGGGAACCTACTTTCTTCTCCCAACCCATCAGGATCGTGGTTGC	3722
	* * * * * * * * * *	
RATON	CCTGGAGCCAAGCAGGAGCTACTG-----TTTCCATAC	2353
RATA	TCAGAAGCCAGCCGGAACCGACTGACTTGCGGATTCGGCATCGCTCCTGTTCCACAC	2464
BOVINO	TTTGTGACTTGAGAAAACCAATG-----TTTCCATAC	2129
HUMANO	AGGGATGCTGCTCCAAGGCCCGTTGTTCCCGACTCGGCTCTTCCCTTTAACTTCCAGGC	3782
	* * *	
RATON	TAGATGTGGGTGGAGGCAGTTCAGGCCAGGAGC---AGGCTTTCTACCTGCTTACCTCT	2410
RATA	TAGATGTGGGTGGGGGCAGTGCAGGCCAGGAGCAGTAGGCTTTCTACCTGCTCACCCTCT	2524
BOVINO	--GCTCTGGGC-----CAGTCCTGACCCACCTC---AGGCGCACGACC-ATAGACGACTA	2178
HUMANO	TGCCTATGCTCTG---AGTGACCACTGGTATGTGTCTCCTCCCTTGACACAGCCACATGAG	3838
	* *** *** * * **	
RATON	G-TGGTATAGAGGACCTTGCTCTGACCCCA-----CCTCCCTGCCTCTGTAGGC	2458
RATA	G-TGGTATGGAGAGCTCACTCTGACGCCATGTCCTCTGCACCTCCCTGCCTCTGTAGGC	2583
BOVINO	G-GTGTCTGG-GGTCCCTGCGCTCACTGC-----TGCTCTCCACAGGC	2220
HUMANO	GATGGGACACAGGAGCTCAGGTAGGCTCAGCCAGACCCTGTGCCCACTTGCTGTGAGGC	3898
	* * * * * * ****	
RATON	TGAAGCCATCAGTGACCATTACCCAGTGGAGGTGACACTCAGAAAAATCTGATGTCATTG	2518
RATA	TGAAGCCATCAGTGACCATTACCCAGTGGAGGTGACACTCAGAAAGACCTGATGTCATTG	2643
BOVINO	CCTGGCCATCAGTGACCATTACCCGGTGGAGGTGACGCTGACATAAGTCC-----CTTCG	2275
HUMANO	CCAAGCCATCAGTGACCACTATCCAGTGGAGGTGATGCTGAAGTGAGC-----	3946
	***** * * * ***** * * *	
RATON	AGCAGTTCAGCCATACTGCTTCTGTTGAGGAAGAATCCACTTCAACTCTATTGGTACTA	2578
RATA	AG---TTAGCCACACTGCTTCCGGTGAGGAAGAGTCCACCTCACCTATGTGTGGTACTG	2700
BOVINO	AGGTCTTC-----	2283
HUMANO	AGCCCCCTCCACACACAGTTGAAGTGCAGGAAGAGAGGACCCATCCTGCCACAGGACCC	4006
	**	

Figura 18. Comparación de las secuencias del gen de la DNasa I en ratón, rata bovino y humano. En amarillo se resaltan las regiones correspondientes a exones y con un asterisco negro aquellos nucleótidos conservados en las cuatro especies. Las secuencias fueron obtenidas de Genbank: humano D83195, ratón U00478, rata U76635 y bovino AF528509.

Calculamos los porcentajes de homología de secuencia entre los exones e intrones del gen de la DNasa I en las cuatro especies. Como era de esperar, la homología entre los exones era mucho mayor que en los intrones (Tabla XI).

Tabla IX. Tamaño de exones en bovino, humano, ratón y rata.

EXON	BOVINO	HUMANO	RATON	RATA
2	147	148	148	148
3	89	89	89	89
4	84	84	84	84
5	118	116	116	116
6	111	113	113	113
7	155	155	155	155
8	97	97	97	97
9	48	44	54	53

Tabla X. Tamaño de los intrones de bovino, humano, ratón y rata.

INTRON	BOVINO	HUMANO	RATON	RATA
2	336	328	256	294
3	176	164	144	144
4	244	395	245	239
5	153	245	312	320
6	89	75	74	74
7	276	379	260	249
8	143	80	170	212

Tabla XI. Porcentaje de homología de secuencia de exones e intrones del gen de la DNasa I de bovino, humano, ratón y rata.

REGION	HOMOLOGIA (%)	REGION	HOMOLOGIA %
EXON2	62	INTRON2	19
EXON3	70	INTRON3	35
EXON4	69	INTRON4	20
EXON5	64	INTRON5	21
EXON6	61	INTRON6	48
EXON7	76	INTRON7	12
EXON8	70	INTRON8	41
EXON9	67	-----	-----

La región codificante del gen bovino estaría, entonces, repartida en 8 exones y tendría más de un 60% de identidad de secuencia nucleotídica con las regiones codificantes de humano, ratón y rata.

3. Determinación de la presencia de DNasa I en el cristalino bovino

Al haber encontrado ARN mensajeros de DNasa I en células epiteliales del cristalino bovino, decidimos investigar la presencia de la proteína en el órgano.

Detección de actividad DNasa I en zimogramas

Buscamos la presencia de actividades nucleasa, que tuvieran los requerimientos iónicos y de pH característicos de la DNasa I, usando zimogramas de nucleasas. Este tipo de procedimiento electroforético nos permitió determinar la movilidad relativa de las nucleasas presentes en fracciones solubles de cristalino. Un procedimiento eficiente de extracción de proteínas contenidas en recintos subcelulares con membrana incluye SDS en la solución de lisis. Rutinariamente empleamos concentraciones de 1-2% de SDS y 2 mM de cloruro de calcio en las soluciones de lisis. Una vez finalizadas las corridas electroforéticas y habiendo eliminado el SDS, los geles fueron incubados a 37°C en solución amortiguadora de pH neutro, conteniendo concentraciones milimolares de calcio y magnesio. Incluimos una muestra de DNasa I pancreática bovina comercial como control interno de la técnica y marcador de movilidad relativa en todos los geles. La banda generada por esta enzima siempre presentó forma de haltera, con ambos extremos levemente ensanchados (Figura 19).

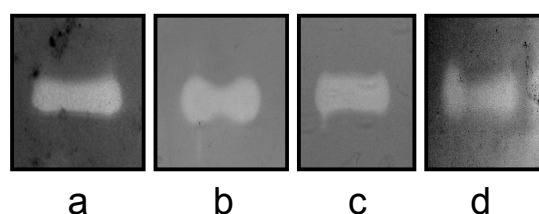


Figura 19. DNasa I pancreática bovina comercial en zimogramas de nucleasas. a y b DNasa I pancreática bovina pura (30 ng) (Boheringer Mannheim), c y d DNasa I pancreática bovina pura (30 ng) (Sigma). Geles de poliacrilamida 15%T, coloreados con azul de Toluidina.

Analizamos tres tipos celulares del cristalino: células epiteliales, fibras del córtex superficial y del núcleo. Sus perfiles electroforéticos en los zimogramas fueron diferentes en dos aspectos: el número de bandas de actividad presentes en cada uno de ellos y la intensidad relativa de cada banda de actividad. En el zimograma que se muestra en la figura 20, la banda de mayor intensidad en el epitelio fue la banda 7, en las fibras corticales la banda 4 y en las fibras nucleares la banda 1.

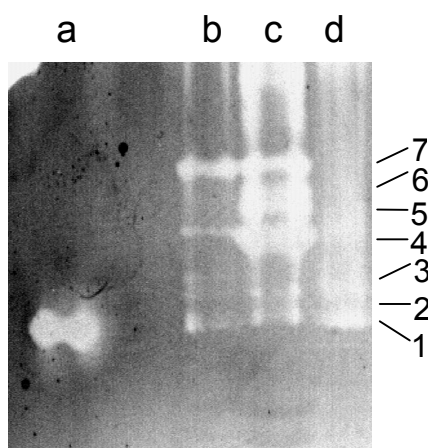


Figura 20. Zimograma de actividades nucleasa a pH neutro y en presencia de calcio y magnesio. a. DNasa I pancreática bovina pura (30 ng), b. células epiteliales, c. fibras del córtex superficial, d. fibras nucleares. Los carriles b, c y d fueron cargados con 50, 70 y 50 µg de proteínas totales cada uno. Gel de poliacrilamida 15%T, coloreado con Azul de Toluidina.

La banda 1 estaba siempre presente en las distintas muestras en todos los zimogramas realizados. Esta banda, que generalmente presentaba forma de haltera, tenía una movilidad electroforética similar a la de la DNasa I pancreática bovina (Figura 20).

Detección de la DNasa I con anticuerpos específicos

Para determinar si la banda 1 identificada en los zimogramas compartía determinantes antigénicos con la DNasa I pancreática bovina hicimos Western-blots. Usamos anticuerpos anti-DNasa I preparados por nosotros, así como otros de origen comercial (Rockland). De aquí en adelante llamaremos AbpR a los anticuerpos anti-DNasa I de origen comercial.

Caracterización de los sueros

Preparamos sueros contra DNasa I inoculando algunos conejos con una solución de la enzima pancreática bovina pura (Sigma) (sueros 2983 y 2965) y otros con una suspensión de la banda electroforética de 30 Kda de la misma preparación (sueros 2984 y 2966). La titulación de los cuatro sueros fue realizada mediante dot-blots revelados, sea con cloronaftol (Figura 21), sea por quimioluminiscencia (Figura 22).

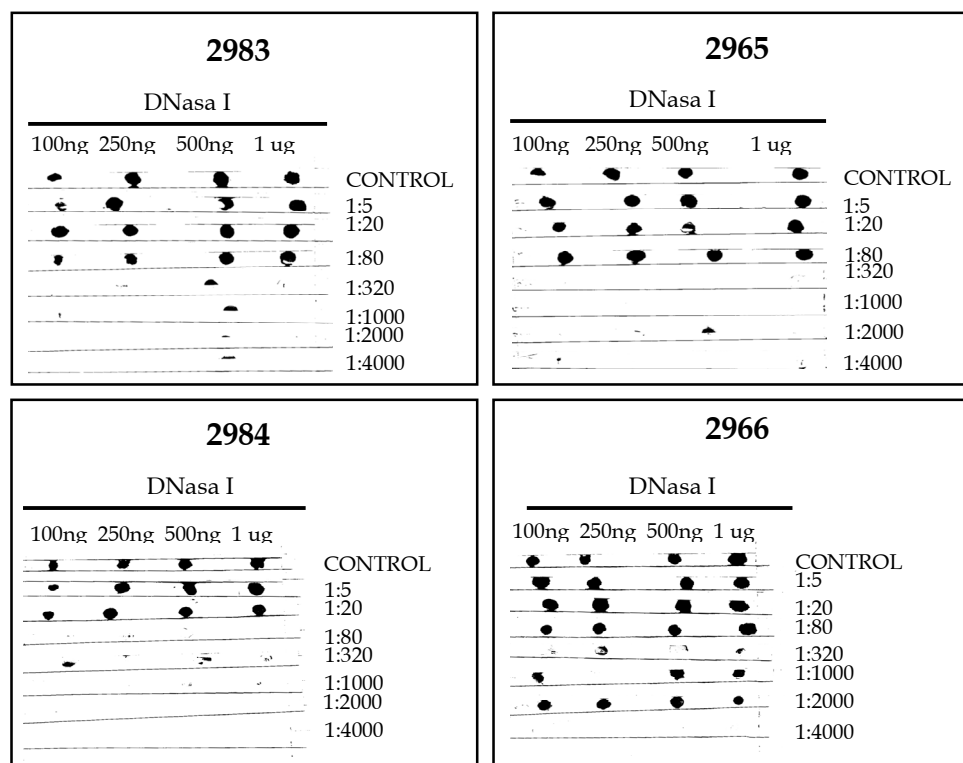


Figura 21. Titulación de los sueros anti-DNasa I denominados 2983, 2965, 2984 y 2966 (revelado de las inmunorreacciones con cloronaftol). La cantidad de DNasa I en los dots varía entre 100 ng y 1 µg. Las diluciones de los sueros entre 1:5 y 1:4000. Como control se utilizó el anticuerpo AbpR (1:500).

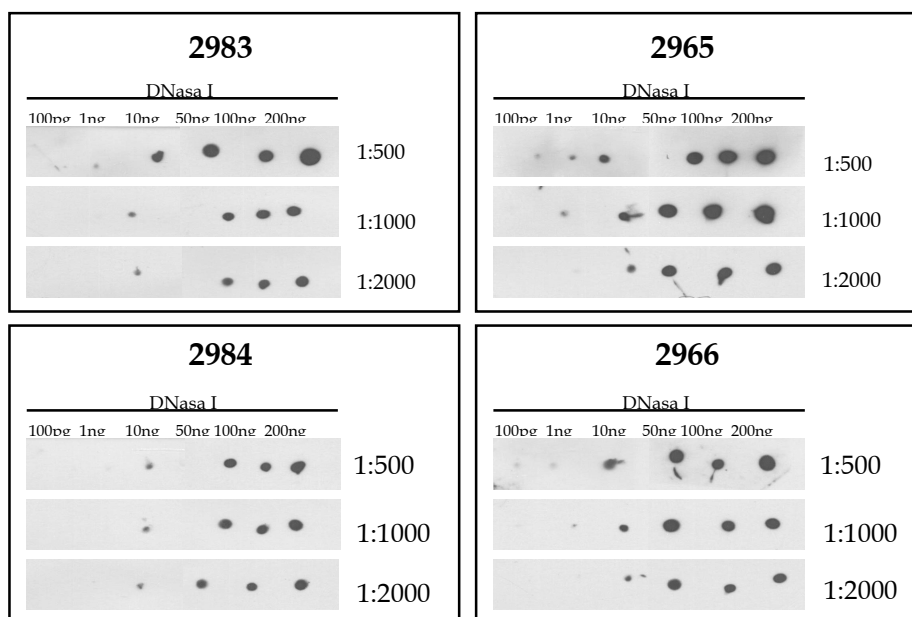


Figura 22. Titulación de los sueros anti-DNasa I denominados 2983, 2965, 2984 y 2966 (revelado de las inmunorreacciones por quimioluminiscencia). La cantidad de DNasa I varía entre 100 pg y 200 ng. Las diluciones de los sueros entre 1:500 y 1:2000

Los umbrales de detección de cada suero fueron diferentes. Ambos procedimientos de revelado mostraron que el suero 2984 era el de más bajo título. Los otros tres sueros, en diluciones de 1:500, detectaban hasta 100 pg de la enzima. De estos tres sueros elegimos el 2983 para utilizar en el resto de este trabajo, ya que en las distintas situaciones en que fuera utilizado, fue el que presentó menos ruido de fondo en el revelado.

En los zimogramas usamos geles de poliacrilamida 15%T/2.6%C. Para poder discernir pequeñas diferencias de movilidad electroforética que pudiesen existir entre la DNasa I pancreática y la cristalínea, usamos geles 12%T/0.9%C. Determinamos la especificidad de los anticuerpos AbpR (Figura 23A) y del suero 2983 (Figura 23B) con DNasa I pancreática bovina comercial y con la fracción SDS-soluble de páncreas bovino mediante Western-blot. Los anticuerpos AbpR reconocieron una banda de similar movilidad electroforética que la DNasa I comercial; sin embargo, reconocieron también otras bandas de mayor y menor tamaño molecular aparente. Incluso este anticuerpo purificado por afinidad, continuó reconociendo, aunque muy levemente, a la banda de mayor tamaño (Figura 23A, carril c). El suero 2983 reconoció una única banda en la muestra de páncreas, de igual movilidad relativa que la DNasa I pura.

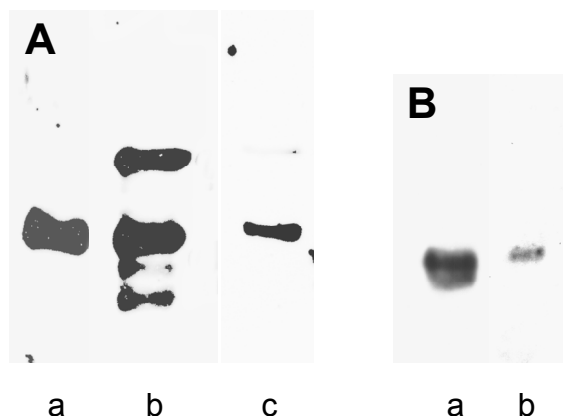


Figura 23. Western-blots de DNasa I pancreática bovina pura y de proteínas SDS-solubles de páncreas bovino. A. anticuerpo AbpR (a y b), anticuerpo AbpR purificado por afinidad en una columna de DNasa I (c), a. DNasa I pura (20 ng), b y c páncreas bovino (20 µg). B suero anti-DNasa I 2983 purificado por afinidad, a. DNasa I pura (20 ng), b. páncreas bovino (20 µg). Gel de poliacrilamida 12%T/0.9%C, Western-blot revelado por quimioluminiscencia.

Inmunodetección de DNasa I en células del cristalino

En los Western-blots realizados sobre muestras de epitelio (Figura 24A) y fibras corticales (Figura 24B) de cristalino con el suero 2983 purificado por afinidad, detectamos una banda de tamaño algo superior al de la enzima pancreática. En las fibras el suero reconocía además, otra banda de mayor tamaño (Figura 24B, carril b señalada con un asterisco). Este mismo suero reconoció dos bandas en la fracción SDS-soluble de parótida bovina, una de idéntico tamaño a la enzima cristalínea y otra, de aspecto difuso y mucho mayor tamaño (Figura 24B, carril c) que no estamos en condiciones de identificar.

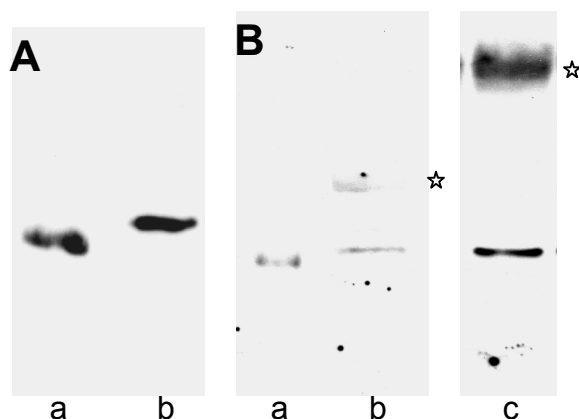


Figura 24. Western-blot de proteínas SDS-solubles de epitelio y fibras corticales de cristalino bovino. Suero anti-DNasa I 2983 purificado por afinidad. A. a. DNasa I pura (20 ng), b. células epiteliales (50 µg). B. a. DNasa I pura (20 ng), b. fibras corticales (50 µg), c. parótida bovina (30 µg). * bandas aun no identificadas. Gel de poliacrilamida 12%T/0.9%C, Western-blot revelado por quimioluminiscencia.

En conclusión, la enzima DNasa I está presente en células epiteliales y fibras del cristalino, presentando un tamaño mayor al de la enzima pancreática pero similar al de la enzima de parótida.

4. Localización de la DNasa I en células del cristalino

Habiendo encontrado DNasa I tanto en el epitelio como en las fibras del cristalino nos propusimos determinar su localización *in situ*, en las subpoblaciones celulares que existen en estos dos componentes estructurales del órgano.

El epitelio cristalino está formado por diferentes subpoblaciones celulares: células quiescentes en las regiones de epitelio central y periférico, células en ciclo mitótico en el epitelio germinativo y células postmitóticas, que han comenzado la diferenciación en fibras (protofibras), en la región más periférica. Ni el tejido ni los anticuerpos secundarios generaron artefactos (autofluorescencia o marcado inespecífico) (Figura I del CD). Realizamos inmunodetecciones con anticuerpos anti-DNasa I sobre cortes sagitales, levemente tangenciales, a nivel de la periferia de cristalinos enteros. Estos cortes incluían epitelio periférico o germinativo y la región apical de fibras corticales. En el epitelio la DNasa I está localizada en todo el citoplasma, quedando excluida de los núcleos, los que están ubicados hacia la región apical de las células (Figura 25A). En algunas células la DNasa I aparece concentrada en la región perinuclear (Figura 25A y B).

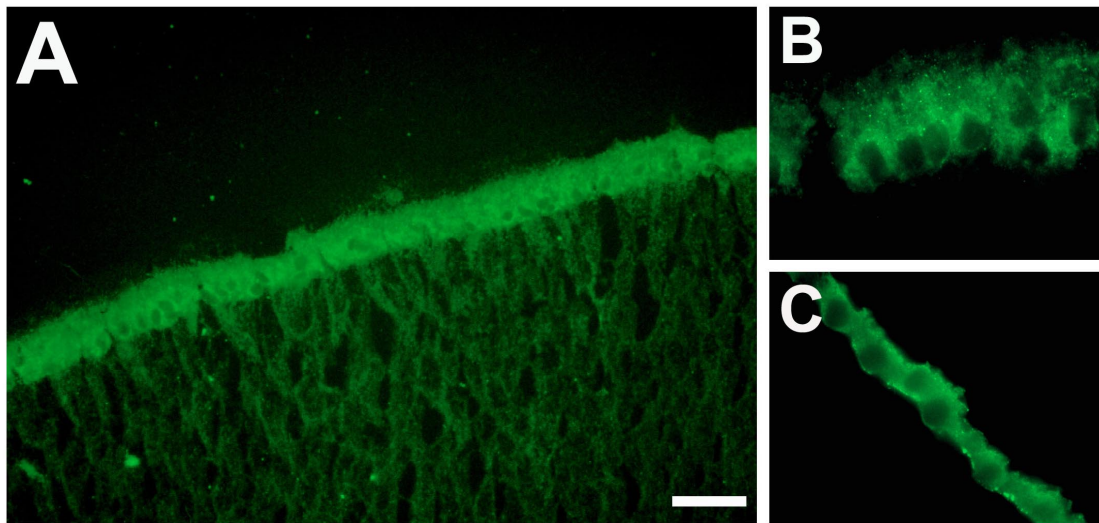


Figura 25. DNasa I en epitelio periférico y central de cristalino bovino adulto. (A-B) epitelio periférico, C. epitelio central. Suero 2983 purificado por afinidad. Barra: A. 25 μ m, B y C. 10 μ m.

Analizamos cortes similares mediante microscopía confocal. En el caso que se muestra en la figura 26, el plano 1 en el eje Z incide algunas células a nivel de la región perinuclear. En una de estas células, la inmunorreactividad de la DNasa I es muy intensa (Figura 26A, punta de flecha) mientras que la señal correspondiente al ADN es prácticamente inexistente (Figura 26B, punta de

flecha). Estas observaciones fueron corroboradas al realizar la superposición de las imágenes correspondientes a ambos marcados (Figura 26C, punta de flecha). Al avanzar 9 μm en el eje Z la misma área aparece negativa para anticuerpos anti-DNasa I (Figura 26D, punta de flecha) al tiempo que exhibe una muy fuerte señal correspondiente al ADN (Figura 26E, puntas de flecha). Esto fue corroborado también, realizando la superposición de las imágenes correspondientes a DNasa I y ADN (Figura 26F, punta de flecha). Nuestros resultados indican que, si bien la DNasa I está excluida del núcleo, se encuentra localizada en el citoplasma perinuclear.

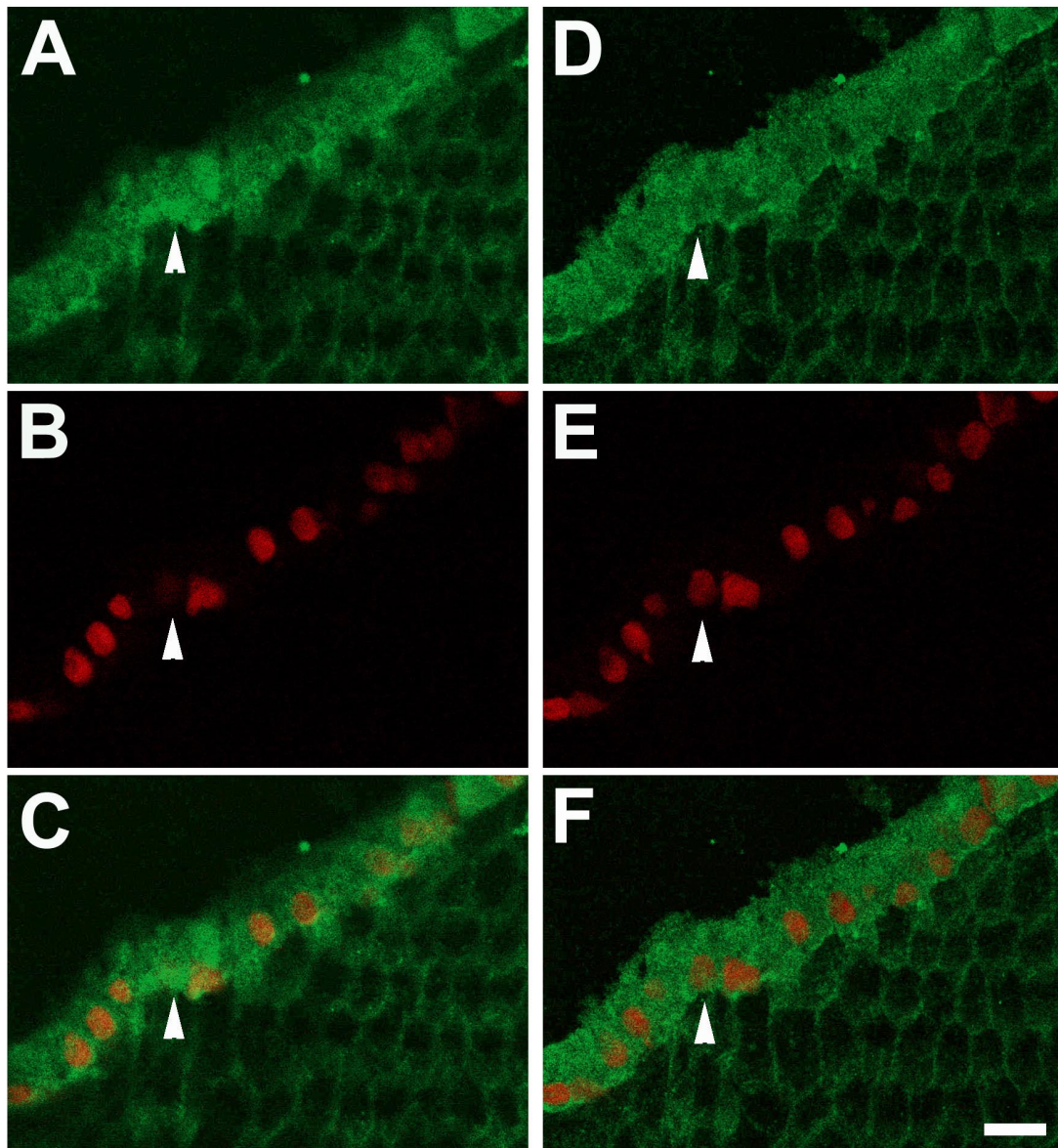


Figura 26. DNasa I en epitelio periférico de cristalino bovino adulto (microscopía confocal). (A-B) Sección óptica 1 de 10 en el eje Z (1 μm de espesor). A. DNasa I, anticuerpo AbpR; B. núcleos, ioduro de propidio; C. superposición de las imágenes A y B. (D-E) Sección óptica 10 (1 μm de espesor). D. DNasa I, anticuerpo AbpR; E. núcleos, ioduro de propidio; F. superposición de las imágenes D y E. Punta de flecha: ver texto. Barra: 10 μm .

Debido a la extrema dureza de la región nuclear del cristalino no pudimos realizar cortes sagitales medios, que comprendieran epitelio central. Realizamos, entonces, cortes de epitelio anterior una vez que fue separado de la región de fibras (como se describe en Materiales y Métodos), lo que nos permitió obtener crio secciones a nivel del epitelio central. Esta región del epitelio fue identificada por la forma redondeada de los núcleos y la distancia existente entre ellos. En estas células la DNasa I también estaba localizada exclusivamente en el citoplasma, pero no detectamos una concentración mayor en la región perinuclear (Figura 25C). Por tanto, esa concentración perinuclear de DNasa I parecía ocurrir únicamente en células epiteliales periféricas, sugiriendo que el emplazamiento subcelular de la enzima sufre una concentración perinuclear progresiva a medida que las células ingresan a la vía de diferenciación en fibras. Para estudiar esta posibilidad realizamos inmunodetecciones con anticuerpos anti-DNasa I sobre cortes gruesos ($>20\text{ }\mu\text{m}$) de cristalinos enteros a nivel ecuatorial, extremadamente inclinados respecto al eje óptico. En este tipo de cortes fue posible analizar células epiteliales postmitóticas (protofibras) y fibras secundarias muy superficiales.

En las protofibras, identificables por la disposición alineada de sus núcleos (hileras meridionales) (Figura 27B), la enzima está concentrada alrededor del núcleo (Figura 27A). En fibras más diferenciadas, que tienen núcleo redondeado, la DNasa I está presente en el citoplasma, acumulada en la región cortical. En algunas de estas células la DNasa I está ubicada también en el territorio nuclear (Figura 27A). Los resultados de estas inmunodetecciones mostraron que la región de acumulación de DNasa I se concentra hacia el territorio nuclear a medida que progresa la diferenciación en fibras.

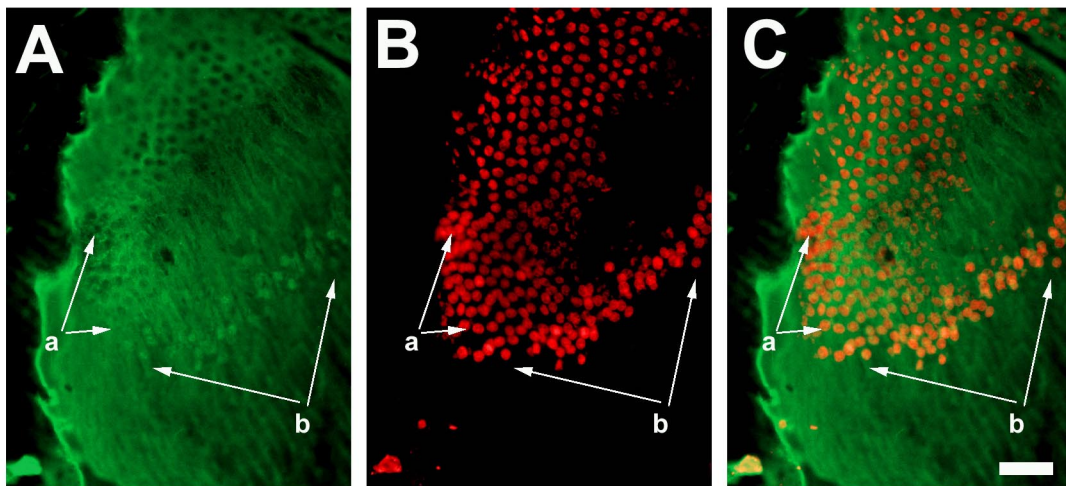


Figura 27. DNasa I en protofibras y fibras corticales superficiales de cristalino bovino adulto. A. DNasa I, anticuerpo AbpR; B. ADN teñido con Hoechst, presentado en rojo para la superposición con la imagen A; C. superposición de las imágenes A y B. a. protofibras, b. fibras superficiales. Barra: $40\text{ }\mu\text{m}$.

En los núcleos elípticos de fibras superficiales, pero más profundas que las descritas precedentemente, el área de inmunorreactividad correspondiente a DNasa I (Figura 28A y IIA del CD) es sensiblemente mayor que la del ADN teñido con Hoechst (Figura 28E y IIB del CD). En efecto, todas las superposiciones de ambos tipos de imágenes producen un anillo de fluorescencia correspondiente a la DNasa I que rodea al área nuclear marcada con Hoechst, como en el ejemplo presentado en la figura 28L (Figura IIC del CD), lo que podría corresponder a una localización en la cisterna perinuclear. En fibras más diferenciadas, localizadas a más de 1 mm de profundidad en el cortex, los núcleos son más elongados; no exhiben tan ostensiblemente el anillo de DNasa I por fuera de la región de ADN marcado (Figura 28B, F y M; 28C, K y N y IID-F del CD). En fibras profundas los núcleos tienen menor volumen y han adquirido forma esférica. En el núcleo que se muestra en la figura 28H (Figura IIH del CD), la cromatina está condensada en sectores discretos y la DNasa I aparece singularmente concentrada en las mismas regiones (Figura 28D y O y Figura IIG e I del CD), también es evidente la presencia de DNasa I en la periferia nuclear.

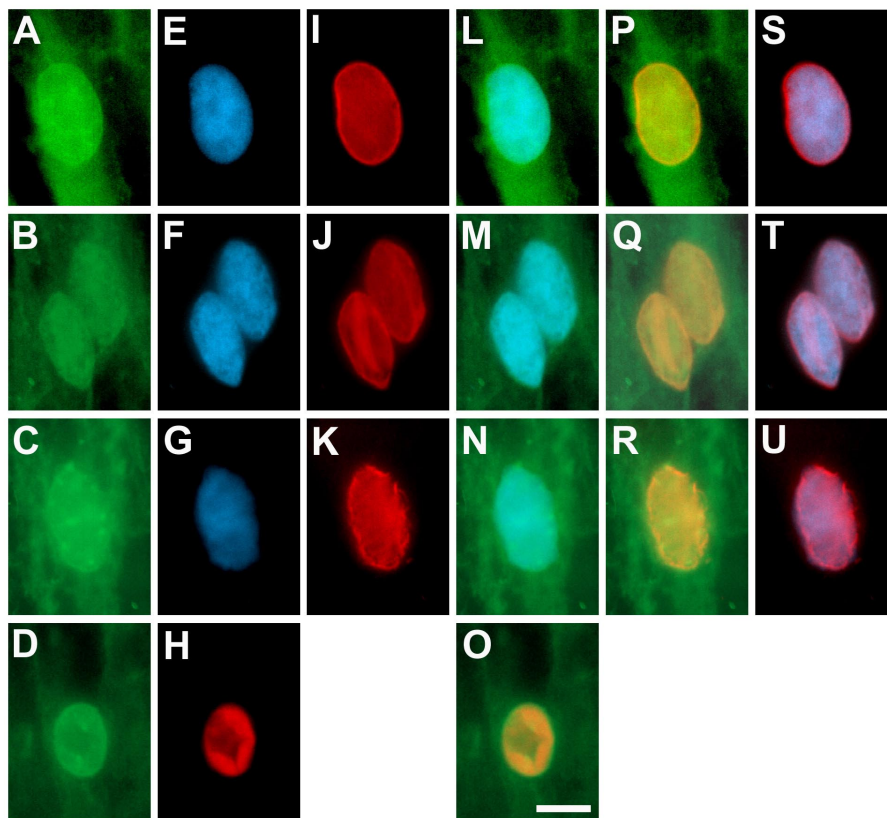


Figura 28. DNasa I, laminas y ADN en fibras corticales superficiales, medias y profundas de cristalino bovino adulto. (A, E, I, L, P y S) núcleo de fibra cortical superficial, (B, F, J, M, Q y T) núcleo de fibra cortical media, (C, G, K, N, R y U) núcleo de fibra cortical profunda, (D, H y O) núcleo picnótico de fibra cortical profunda. (A-D) DNasa I, suero 2983 purificado por afinidad, (E-G) Hoechst, H. ioduro de propidio, (I-K) laminas, anticuerpo L3f4, (L-O) superposición de las imágenes correspondientes a DNasa I y ADN, (P-R) superposición de las imágenes correspondientes a DNasa I y laminas, (S-U) superposición de las imágenes correspondientes a laminas y ADN. Barra: 5 μ m.

Estos resultados sugieren que las fibras avanzadas en la diferenciación terminal, en las que el proceso de eliminación de los organelos ya se inició, al menos una fracción de la DNasa I de la periferia nuclear sería translocada al interior del núcleo. Para analizar esta hipótesis realizamos cortes perpendiculares al eje óptico, en los que el plano de corte atravesó núcleos redondeados. La inmunolocalización de la DNasa I mostró que la enzima estaba ubicada en el citoplasma cortical y en el interior de los núcleos (Figura 29). Para obtener más evidencias analizamos con microscopía confocal un conjunto de cortes sensiblemente transversales de fibras corticales profundas.

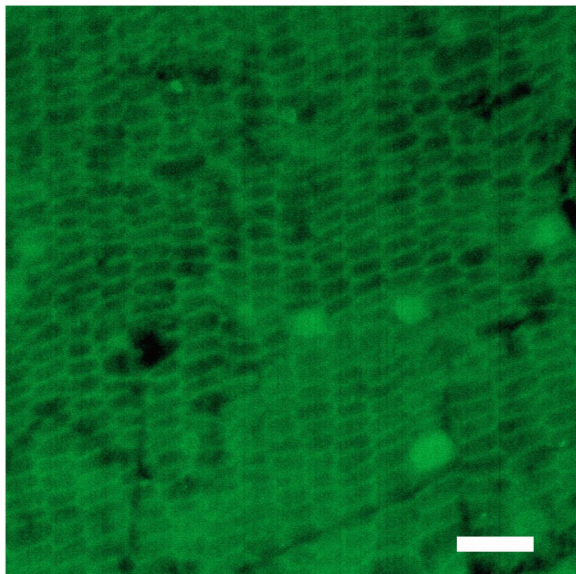


Figura 29. DNasa I en fibras corticales profundas de cristalino bovino adulto. Suero 2983 purificado por afinidad. Barra: 10 μm .

La figura 30 A-C muestra una de once secciones ópticas de 0.5 μm de espesor en las que hay co-localización de DNasa I y ADN en núcleos de fibras profundas (Video 1 en CD).

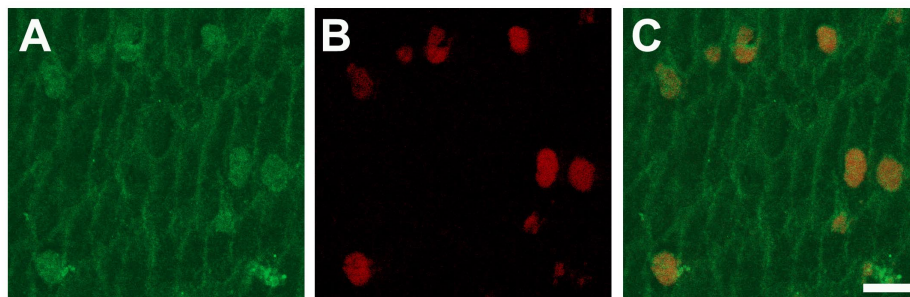


Figura 30. DNasa I en fibras corticales profundas de cristalino bovino adulto (microscopía confocal). (A-B) Sección óptica de 0.5 μm de espesor. A. DNasa I, anticuerpo AbpR, B. núcleos, yoduro de propidio, C. superposición de las imágenes A y B. Barra: 10 μm .

En conjunto, nuestros resultados indican que la DNasa I transloca al interior del núcleo en las fibras profundas, planteando la interrogante del mecanismo por el cual esto se lleva a cabo. Una posible explicación es que esta translocación ocurra una vez que la envoltura nuclear haya comenzado a desintegrarse. Para abordar este problema, comenzamos estudiando las membranas de núcleos elípticos y esféricos usando la sonda lipofílica fluorescente DiOC₆. El marcado generado por esta sonda, en cortes paralelos al eje óptico del cristalino, mostró que la membrana nuclear de núcleos elípticos está intacta (Figura 31A). Sin embargo, en los núcleos esféricos de fibras más diferenciadas la membrana nuclear parece haber perdido continuidad (Figura 31B).

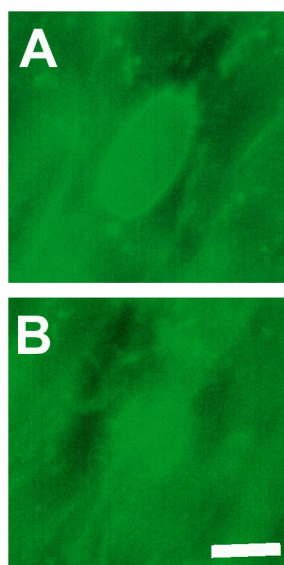


Figura 31. Envoltura nuclear en fibras corticales medias y profundas. Marcado con la sonda lipofílica DiOC₆. A. núcleo de fibra cortical media, B. núcleo de fibra cortical profunda. Barra: 5 μ m.

Otro de los componentes de la envoltura nuclear que es degradado durante el proceso de desintegración de los núcleos es la lámina nuclear. Para ponerla en evidencia usamos el anticuerpo monoclonal L3f4, que reconoce todos los tipos de laminas de mamíferos. Para poder establecer el emplazamiento de la DNasa I en relación a la lámina nuclear realizamos triples marcados, con anticuerpos anti-DNasa I, L3f4 y Hoechst en cortes de fibras corticales superficiales, medias y profundas.

En núcleos de fibras superficiales, la DNasa I está localizada en la periferia nuclear. Su distribución es heterogénea, presentando abundantes sitios puntiformes de mayor intensidad (Figura 28A). En las superposiciones de las imágenes de inmunolocalización de DNasa I y marcado del ADN con Hoechst, observamos un anillo de fluorescencia correspondiente a la DNasa I por fuera del ADN como describimos anteriormente (Figura 28L). La lámina nuclear está intacta (Figura 28I) y ubicada externamente respecto al ADN marcado (Figura 28S). En los núcleos de fibras corticales medias, el patrón de marcado de los

anticuerpos fue similar, aunque los parches más inmunoreactivos correspondientes a DNasa I son de mayor tamaño (Figura 28B). En núcleos de fibras profundas el proceso de compactación de la cromatina ya ha comenzado, pues se observan regiones de condensación de ADN (Figura 28G). La DNasa I está distribuída en todo el núcleo, pero es posible apreciar que la inmunorreactividad de la enzima es más intensa en la periferia nuclear y en algunos acúmulos muy conspicuos (Figura 28C). El marcado con el anticuerpo L3f4 es irregular, hay zonas periféricas que son discontinúas (Figura 28K), la lámina nuclear presenta importantes perforaciones.

Analizamos también la distribución de DNasa I y laminas en fibras profundas mediante microscopía confocal. La figura 32 muestra una sección óptica de 0.1 μm de espesor. En algunos núcleos (marcados con puntas de flecha) se puede apreciar que la inmunorreactividad de la DNasa I está presente en todo el núcleo (Figura 32A). El marcado de las laminas aparece claramente concentrado en la periferia nuclear (Figura 32B), indicando que la sección óptica pasó por un sector interno del núcleo. En ese mismo campo se puede observar un núcleo cuya lámina nuclear está incompleta (Figura 32B, flecha), confirmando que estos núcleos pertenecen a fibras diferenciadas profundas. Por tanto, la DNasa I está presente en el interior de núcleos en los que las laminas están siendo degradadas.

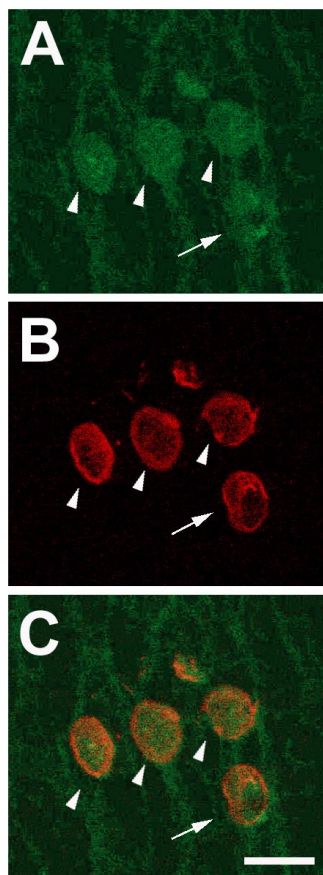


Figura 32. DNasa I en núcleos de fibras corticales profundas de cristalino bovino adulto (microscopía confocal). (A-B) Sección óptica de 0.1 μm de espesor. A. DNasa I, anticuerpo AbpR; B. laminas, anticuerpo L3f4; C. superposición de las imágenes A y B. Flechas y puntas de flecha: ver texto. Barra: 10 μm .

La DNasa I realiza cortes en el ADN dejando extremos 3'OH libres. Para determinar en qué núcleos aparecía este tipo de corte en el ADN, realizamos la técnica TUNEL sobre criosecciones de cristalino. Los núcleos totalmente colapsados eran intensamente TUNEL positivos (Figura 33B).

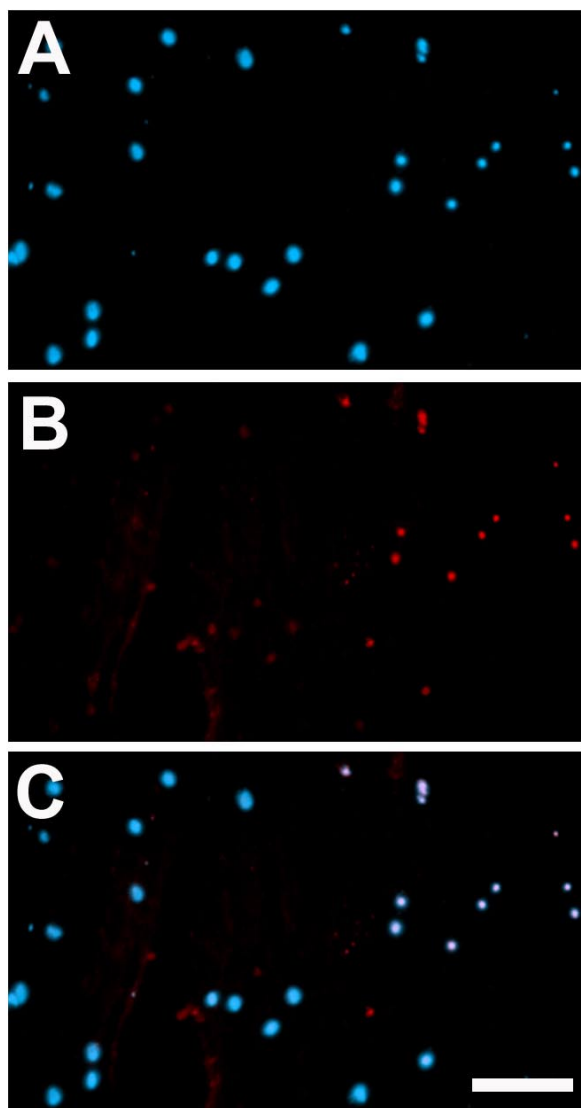


Figura 33. Cortes 3'OH libres en el ADN de núcleos de fibras corticales de cristalino bovino adulto (técnica TUNEL). A. Hoechst; B. TUNEL; C. superposición de las imágenes A y B. Barra: 50 μ m.

El ADN fragmentado aparece en núcleos de forma casi esférica (Figura IIIA-C del CD). Las regiones de alta densidad de cortes en el ADN, visibles como regiones intensamente TUNEL positivas, ocupan zonas parciales del ADN compactado de estos núcleos (Figura 34A-C). Estos resultados, si bien preliminares, sugieren que el proceso de generación de cortes que exponen extremos 3'OH en el ADN se intensifica en núcleos en los que aún no culminó el proceso de colapso nuclear.

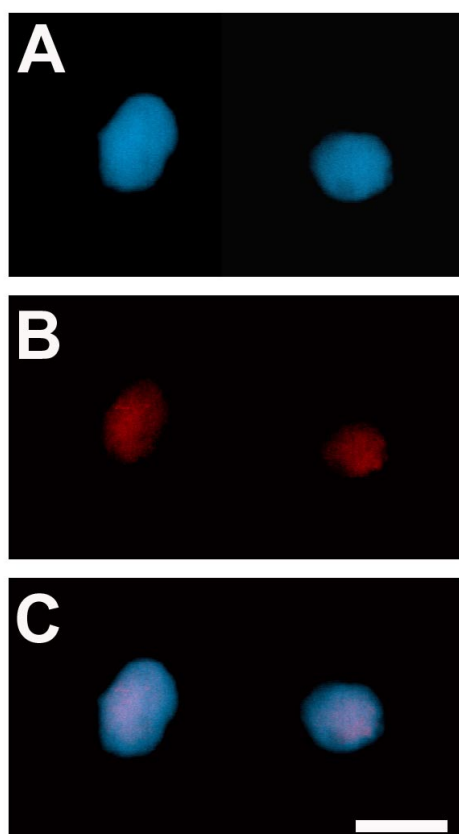


Figura 34. Sectores TUNEL positivos en núcleos de fibras corticales profundas de cristalino bovino adulto. A. Hoechst; B. TUNEL; C. superposición de las imágenes A y B. Barra: 5 μ m.

El conjunto de estos resultados indica que la DNasa I ingresa a núcleos en los que ya ha comenzado la desintegración de los componentes de la envoltura nuclear. También sugieren que esta translocación ocurre antes de la aparición de un gran número de cortes 3'OH libres en el ADN.

5. DNasa I en células epiteliales del cristalino bovino "in vitro"

Las células del epitelio anterior del cristalino pueden ser mantenidas *in vitro* durante largos períodos de tiempo. Mantienen una forma poligonal epitelioide (Figura 35A), pero el perfil electroforético de fracciones de sus proteínas SDS-solubles no es idéntico al de células epiteliales *in vivo* (Figura 35B). Estas células pueden adquirir grandes dimensiones, hasta 500 μ m de diámetro, por lo que si la DNasa I estaba presente en ellas, podríamos determinar su localización subcelular en detalle. Es bien conocido el hecho de que las células BEL producen transcritos que no son traducidos, como es el caso de las cristalinas, alfa-cristalina especialmente. Por lo tanto, al haber demostrado la presencia de ARN mensajeros para la DNasa I abordamos la búsqueda de la proteína en estas células.

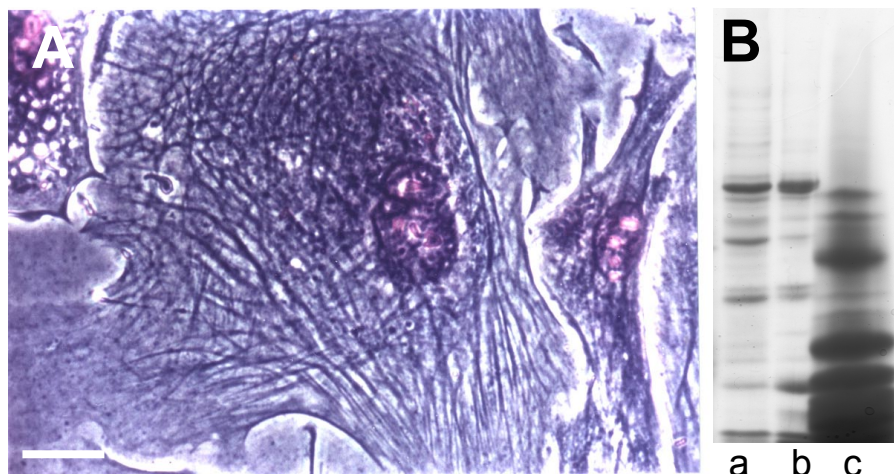


Figura 5. A. Célula epitelial de cristalino bovino adulto “*in vitro*”, célula BEL. Coloración May Grünwald-Giemsa, microscopía de contraste de fase. Barra: 30 µm. **B. Proteínas SDS-solubles de células BEL, epitelio y fibras corticales de cristalino bovino adulto.** a. células BEL (50 µg), b. epitelio (50 µg), c. fibras corticales (200 µg). Gel de poliacrilamida 12%T/0.9%C, coloreado con Azul Brillante de Coomassie 250R.

Actividad DNasa I en células BEL

Para determinar la presencia de actividades tipo DNasa I en células BEL realizamos zimogramas, como los utilizados para su determinación en células del cristalino. Los cultivos de células BEL fueron homogeneizados en una solución amortiguadora de pH neutro, conteniendo calcio y SDS. Las muestras fueron preparadas para electroforesis agregándoles DTT y glicerol. Como control de la técnica y marcador de movilidad relativa, siempre se incluyó una muestra de DNasa I pancreática bovina comercial. Analizamos muestras de cultivos primarios y de diversos pasajes. En todos los casos estudiados (hasta el 9º pasaje) las bandas de actividad nucleasa detectadas fueron de 30-35 Kda. Al igual que en las células de cristalino, el peso molecular aparente de esta proteína fue un poco mayor que el de la enzima pancreática y al igual que ésta, producía una banda con forma de haltera en la gran mayoría de los casos (Figura 36).

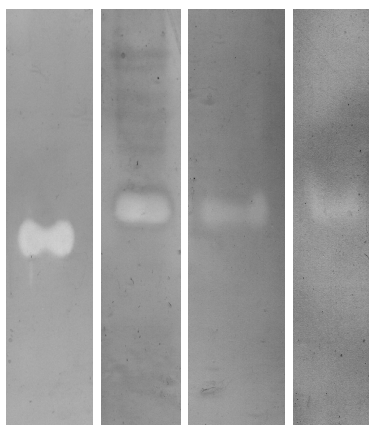


Figura 36. Zimograma de actividades nucleasa a pH neutro y en presencia de calcio y magnesio de proteínas SDS-solubles de células BEL. a. DNasa I pancreática bovina comercial (30 ng), b. cultivo primario, en fase de proliferación, c. 5º pasaje, d. 9º pasaje. Geles de poliacrilamida 12%T/0.9%C, coloreados con Azul de Toluidina. Los carriles b-d contienen ≈100 µg de proteínas totales.

Immunodetección de la DNasa I en células BEL

Las proteínas SDS-solubles de células BEL fueron analizadas en Western-blots con el suero 2983 purificado por afinidad y con AbpR. Ambos anticuerpos reconocieron una única banda en muestras de cultivos de distintos pasajes. Esta banda exhibió un peso molecular aparente un poco mayor que el de la enzima pancreática (Figura 37), diferencia de tamaño similar a la encontrada en los zimogramas.

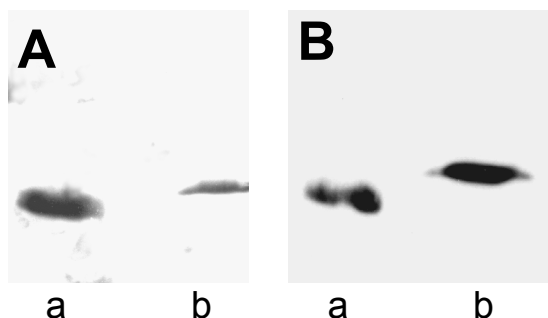


Figura 37. Western-blot de proteínas SDS-solubles de células BEL. A. anticuerpo AbpR, B. suero 2983 purificado por afinidad. a. DNasa I pancreática bovina comercial (20 ng), b. células BEL (50 µg). Western-blot revelado por quimioluminiscencia.

Los resultados obtenidos en los zimogramas de nucleasas y Western-blots indicaron que las células BEL expresaban DNasa I, inclusive después de un elevado número de duplicaciones celulares *in vitro* (más de 20 ciclos) así como de largas estadías en confluencia. Asimismo que la enzima que se expresaba *in vitro* tenía un tamaño similar al de *in vivo*.

Immunolocalización de la DNasa I en células BEL

Distribución de la DNasa I

Con el objeto de optimizar condiciones de fijación probamos dos fijadores, paraformaldehído (PAF) y metanol. En las células fijadas con PAF utilizamos el detergente no-iónico Tritón X-100 como agente de permeabilización; en el caso del metanol, el paso de permeabilización no era necesario. En células fijadas con PAF, la DNasa I estaba distribuida en todo el citoplasma, aunque concentrada en la región perinuclear. Allí aparecía en estructuras con forma de cisterna, que podrían corresponder al retículo endoplásmico y/o aparato de Golgi. En el resto del citoplasma la enzima se encontraba en vesículas de pequeño diámetro (Figura 38A y B). Cuando usamos metanol como fijador, el patrón de marcado generado por los anticuerpos a-DNasa I fue relativamente similar al encontrado en células fijadas con PAF, incluso en el aumento de la señal fluorescente en la región adyacente al núcleo (Figura 38C). También distinguimos estructuras tubulares y vesiculares marcadas con los anticuerpos, aunque las mismas no aparecían tan bien definidas como en las células fijadas con PAF. La diferencia observada con ambos fijadores podría deberse a la propiedad del metanol de solubilizar lípidos. Estos podrían haber sido extraídos de las membranas de los organelos,

cambiando en parte su morfología, y dificultando así su reconocimiento. Concluimos que el PAF era el fijador que mejor preservaba las estructuras en las que la DNasa I parecía estar contenida, por lo que lo utilizamos en el resto de las inmunodetecciones.

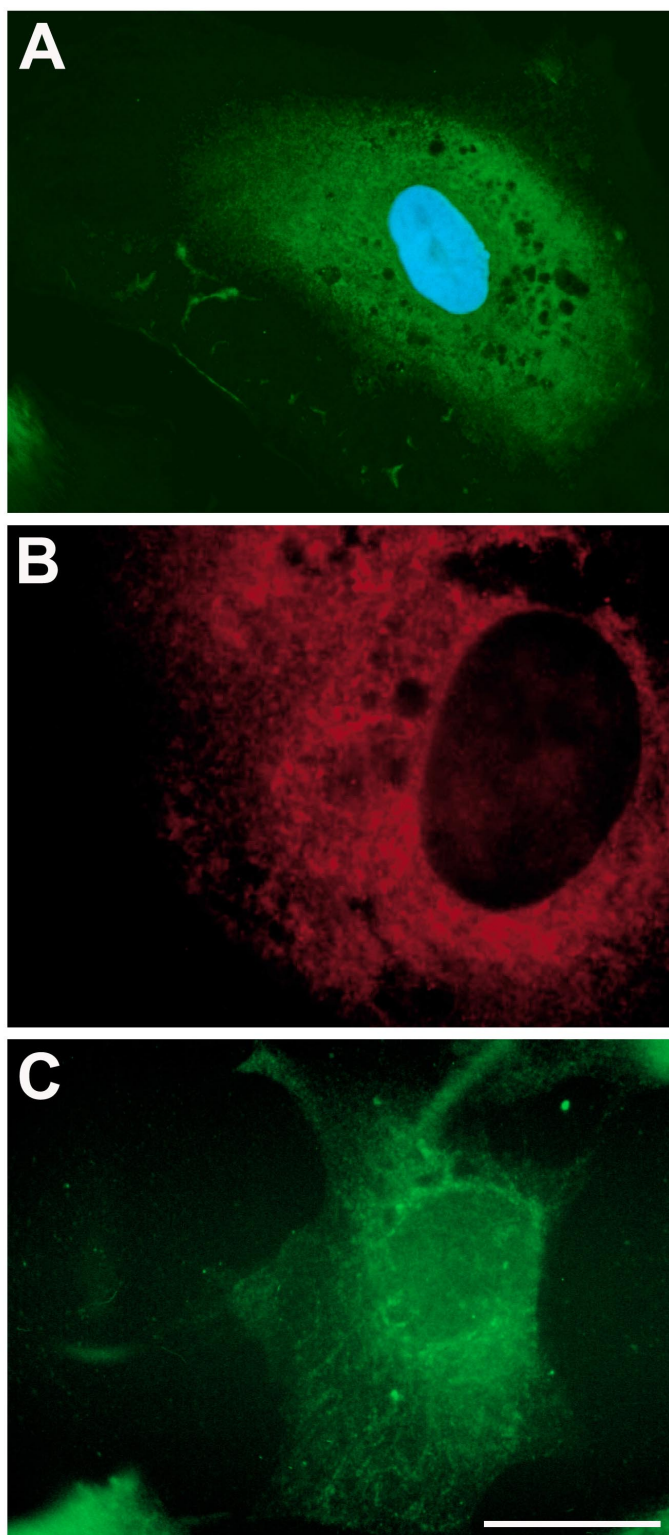


Figura 38. DNasa I en células BEL. A. DNasa I, suero 2983 purificado por afinidad, núcleo teñido con Hoechst; B. DNasa I, suero 2983 purificado por afinidad; C. DNasa I, anticuerpo AbpR, fijación en metanol. Barra: A y C: 60 μ m, B. 30 μ m.

Los patrones de distribución de la DNasa I obtenidos con AbpR y el suero 2983, tanto sin purificar como purificado por afinidad fueron similares al descrito en el párrafo anterior (Figura IV del CD).

Distribución de organelos con membrana

La posibilidad de que la DNasa I esté emplazada en los organelos de la vía de secreción de proteínas, nos llevó a estudiar la distribución de estos organelos en células BEL. El conocimiento de la precisa localización del retículo endoplásmico nos permitiría determinar si en éste la DNasa I es una proteína residente o si se encuentra en tránsito. Para marcar las membranas internas utilizamos la sonda lipofílica fluorescente DiOC₆ que se incorpora a las membranas del retículo endoplásmico, aparato de Golgi, vesículas, núcleo y mitocondrias de células vivas. La señal generada por el DiOC₆ estaba distribuida en toda la célula, llegando incluso muy cerca de la membrana plasmática. Esta señal no era homogénea, estaba concentrada en la región adyacente al núcleo (Figura 39A). En algunas células la envoltura nuclear fue claramente visible (Figura V del CD), en otras localizamos el retículo endoplásmico y/o aparato de Golgi ubicados alrededor del núcleo (Figura 39A, puntas de flecha), con un patrón similar al presentado por la DNasa I en esta región celular. El retículo endoplásmico forma además una red de túbulos muy delgados localizados en la periferia celular, como fuera descrito por Terazaki y colegas (1984) (Figura 39A, flechas delgadas). Sin embargo, nunca observamos un emplazamiento similar para la DNasa I, sugiriendo que ésta no es una proteína residente de dicho organelo. Las vesículas son de diversos tamaños, el diámetro de las más grandes varía entre tres y diez micras (Figura 39A, flechas gruesas), y generalmente están localizadas entre el límite externo de la región ocupada por el retículo endoplásmico/aparato de Golgi y la periferia celular.

Localización de las mitocondrias

Como dijimos anteriormente, las membranas mitocondriales son marcadas por la sonda DiOC₆. Por lo tanto para poder identificarlas en el patrón general de marcado del DiOC₆, estudiamos su distribución con la sonda fluorescente rodamina 123, específica para este organelo. Esta sonda utiliza el potencial de membrana de las mitocondrias para ingresar a las mismas, por lo que el marcado solo se puede realizar sobre células vivas. En todas las células BEL estudiadas, si bien estos organelos aparecieron distribuidos en toda la célula, detectamos una acumulación diferencial de los mismos en la región perinuclear, como se muestra en la figura 39B. Fue posible individualizar mitocondrias y determinar que tienen longitudes diversas, desde pequeños bastones de 1.5 µm, a filamentos de más de 6 µm de largo. Considerando estos resultados y los obtenidos en las

immunolocalizaciones de DNasa I, podemos concluir que la enzima no se encuentra presente en las mitocondrias.

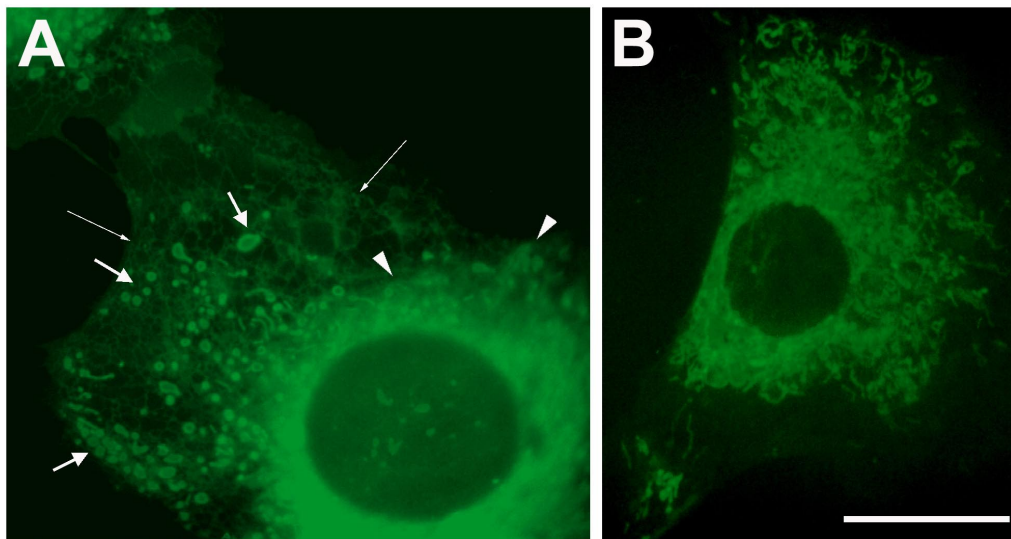


Figura 39. Organelos con membrana en células BEL. A. Marcado con la sonda lipofílica DiOC₆; puntas de flecha: retículo endoplásmico y aparato de Golgi, flechas delgadas: retículo endoplásmico cortical, flechas gruesas: vesículas. B. Marcado mitocondrial con la sonda rodamina 123. Barra: 30 µm.

El conjunto de resultados obtenidos indica que en las células BEL, la DNasa I estaría ubicada en el retículo endoplásmico y aparato de Golgi localizados en regiones yuxtannucleares, y en pequeñas vesículas de secreción. Para determinar, entonces, si hay co-localización de estos organelos y la DNasa I, realizamos dobles marcados con el anticuerpo AbpR y la sonda DiOC₆, que fueron analizados por microscopía confocal. Analizamos 11 secciones ópticas (1 µm de espesor) en el eje Z, de varios campos de diferentes cultivos, lo que nos permitió estudiar las células desde su cara apical a la basal.

En el ejemplo que se muestra en la Figura 40, la DNasa I se encuentra en estructuras membranosas localizadas alrededor del núcleo y en vesículas (Figura 40B). Éstas últimas parecen distribuirse en forma de gradiente, ya que observamos un mayor número de ellas en la región basal de las células (Figura 40C). Al comparar las imágenes dadas por el anticuerpo AbpR (Figura 40B) y la sonda lipofílica DiOC₆ (Figura 40E), detectamos que la región perinuclear marcada por la sonda lipofílica era mayor que la marcada por el anticuerpo. Esto sugiere que la distribución de la DNasa I en el retículo endoplásmico y aparato de Golgi estaría regionalizada. La distribución de vesículas marcadas con DiOC₆ en las secciones ópticas 5 y

11 (Figura 40E y F, respectivamente) no presentó ningún cambio, sugiriendo una homogénea distribución de las mismas en las regiones media y basal de las células. La comparación de los patrones vesiculares marcados con AbpR y DiOC₆ en esas secciones ópticas, muestra que la DNasa I está presente sólo en una subpoblación de vesículas, que parece estar dirigida hacia la región basal de la célula (Figura 40H e I).

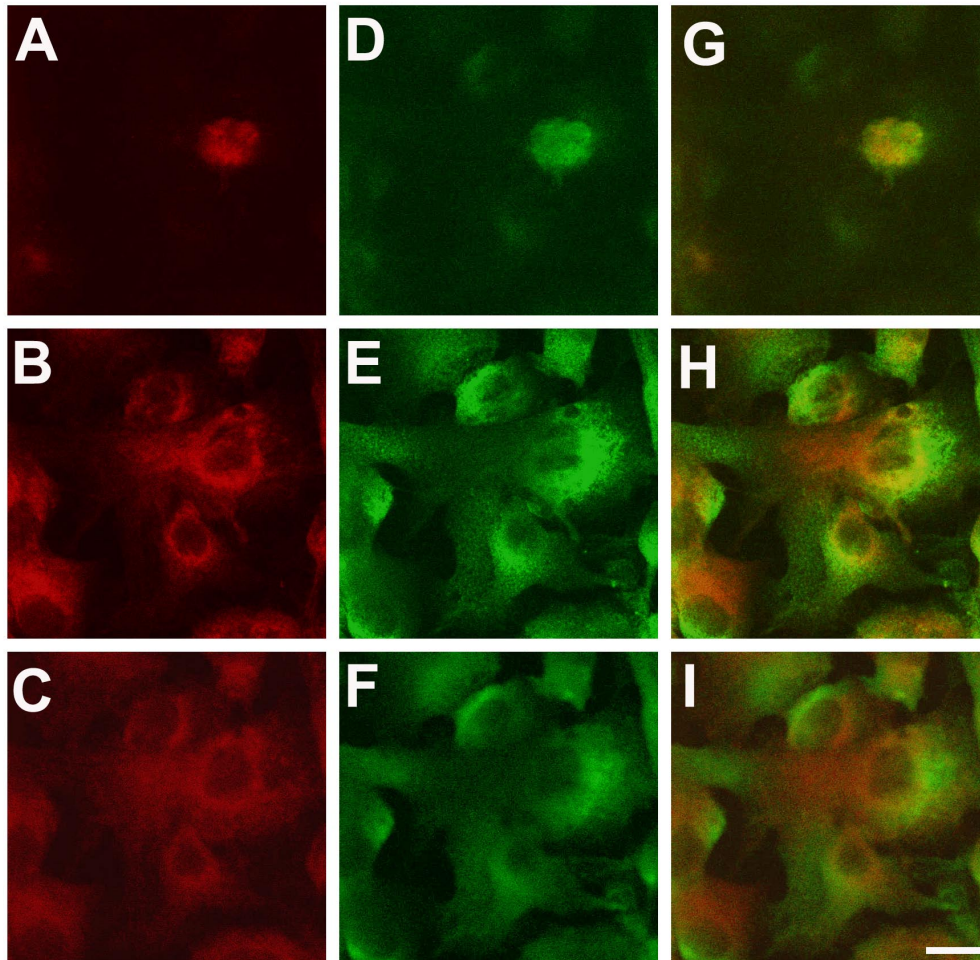


Figura 40. DNasa I y organelos con membrana en células BEL (microscopía confocal). (A, D) Sección óptica 1 de 11 en el eje Z (1 μm de espesor) región apical de las células, (B, E) sección óptica 5 de 11, región media de las células; (C, F) sección óptica 11 de 11, región basal de las células. (A-C) DNasa I, anticuerpo AbpR; (D-F) organelos con membrana, sonda lipofílica DiOC₆, (G-I) superposición de las imágenes correspondientes a DNasa I y organelos con membrana. Barra: 30 μm .

Todos los resultados indican que la DNasa I se encuentra en el retículo endoplásmico y aparato de Golgi en zonas muy adyacentes al núcleo, así como en vesículas de secreción concentradas hacia la región basal de la

célula. Otra evidencia a favor de esta localización sería observar cambios en el patrón de marcado de los anticuerpos a-DNasa I cuando estas estructuras fuesen eliminadas. Para comprobar esta hipótesis realizamos experimentos de extracción de componentes Tritón-solubles antes y después de la fijación.

Efectos de la extracción tritónica sobre la distribución de la DNasa I

En una serie de experimentos las células fueron fijadas con PAF y luego permeabilizadas con Tritón X-100 al 0.1% durante diferentes intervalos de tiempo. Como el fijador PAF realiza perforaciones en las membranas permitiendo cierto grado de entrada de los anticuerpos, realizamos inmunolocalizaciones sobre células no-permeabilizadas como control. En estas células la señal de los anticuerpos a-DNasa I fue de baja intensidad y estaba concentrada en una región ubicada lateralmente respecto al núcleo (Figura 41A). Es posible que los anticuerpos no hayan tenido acceso a todos los territorios donde hay DNasa I y solo se haya marcado un sector de retículo endoplásmico, aparato de Gogi o un acúmulo de vesículas, ubicados hacia la región apical de las células. En células permeabilizadas durante 5 minutos (protocolo de uso habitual), la distribución de la DNasa I fue la descrita anteriormente (Figura 41B). Sin embargo, en células permeabilizadas por 20 minutos, las cisternas y estructuras tubulares ya no fueron visibles y los anticuerpos ponen en evidencia una distribución vesicular de la enzima (Figura 41C).

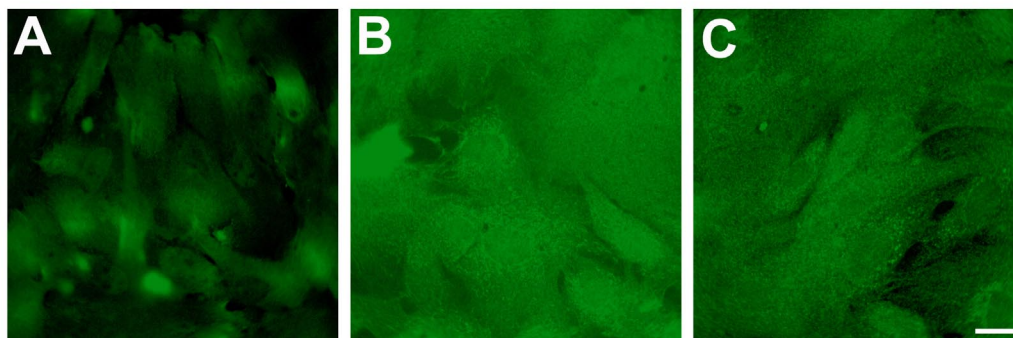


Figura 41. DNasa I en células BEL fijadas en PAF y permeabilizadas con Tritón X-100 al 0.1%. Suero 2983 purificado por afinidad. A. células sin permeabilizar, B. células permeabilizadas 5 minutos, C. células permeabilizadas 20 minutos. Barra: 30 μ m.

Para que los anticuerpos tengan completo acceso a la DNasa I es necesario realizar un leve tratamiento con detergente que permeabilice las membranas. Por otro lado, los tratamientos prolongados provocan cambios estructurales tales que llevan a la vesicularización de las membranas y a la desaparición del patrón de distribución habitual de la DNasa I. Estos

resultados aportan evidencias indicadoras de que la DNasa I está contenida en estructuras con membrana.

En una segunda serie de experimentos realizamos extracciones a baja temperatura con Tritón X-100 al 0.5% sobre células sin fijar. Los tiempos de extracción fueron de 30 segundos, 1, 2, 4 y 10 minutos, luego de los cuales las células fueron fijadas en PAF. Posteriormente realizamos las inmunodetecciones obviando el paso de permeabilización. En estos experimentos, las células fijadas directamente en PAF y luego permeabilizadas con Tritón X-100 al 0.1% durante 5 minutos fueron consideradas como control (Figura 42A).

La extracción con Tritón X-100 provocó cambios en las células que se reflejaron en la distribución de la DNasa I. La señal correspondiente a la enzima disminuye en función del tiempo de extracción. La DNasa I desaparece de las cisternas y túbulos yuxtannucleares y se localiza en estructuras vesiculares grandes y en la periferia del núcleo (Figura 42B). Una posible explicación para estos resultados es que el tratamiento con Tritón X-100 desorganice las membranas internas de forma tal de causar su vesicularización parcial o total. La DNasa I podría haber quedado contenida en esas vesículas o haber sido eliminada durante los lavados previos a la fijación. En estos experimentos resultó particularmente llamativo que subsiste un marcado importante en el área nuclear.

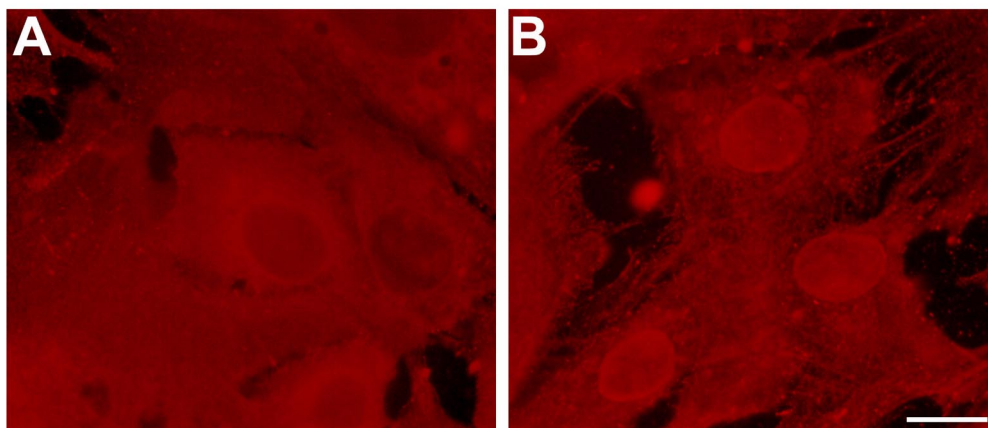


Figura 42. DNasa I en células BEL extraídas con Tritón X-100 al 0.5%. Suero 2983 purificado por afinidad. A. células sin extraer, permeabilizadas con Tritón X-100 al 0.1% 5 minutos, B. células extraídas 4 minutos. Barra: 30 μ m.

Teniendo en cuenta los resultados previos, repetimos los experimentos de extracción con Tritón X-100 al 0.5% prefijación estudiando simultáneamente la distribución de la DNasa I y de los organelos con membrana (Figura 43). La desaparición de la enzima de la región yuxtannuclear (Figura 43D) coincide con la desaparición de las estructuras

membranosas, como retículo endoplásmico y aparato de Golgi (Figura 43E). Sin embargo, la periferia nuclear es muy positiva para DiOC₆ (Figura 43E), indicando la persistencia de membranas estructuradas en la envoltura nuclear, lo que podría explicar la permanencia de la enzima en el espacio de la cisterna perinuclear.

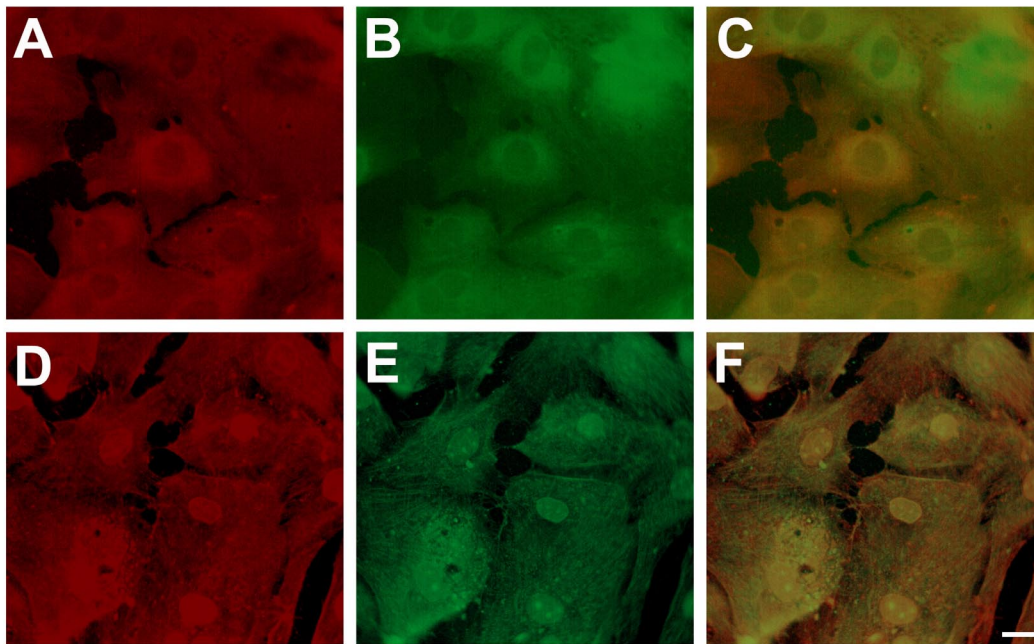


Figura 43. DNasa I y organelos con membrana en células BEL extraídas con Tritón X-100 al 0.5%. (A-C) células sin extraer, permeabilizadas con Tritón X-100 al 0.1% 5 minutos, (D-F) células extraídas 2 minutos. (A, D) DNasa I, suero 2983 purificado por afinidad, (B, E) organelos con membrana, DiOC₆, (C, F) superposiciones de las imágenes correspondientes a DNasa I y organelos con membrana. Barra: 30 μ m.

6. Liberación de DNasa I al medio extracelular.

La presencia de DNasa I en organelos involucrados en la secreción de proteínas, sugirió la posibilidad de que las células BEL secretaran la enzima al medio de cultivo. Para determinar su presencia en el medio los cultivos de células BEL fueron repicados y mantenidos durante 72 horas en medio de cultivo suplementado con suero fetal bovino. Como el suero posee DNasa I, transcurridos esos tres días y luego de extensos lavados, sustituimos dicho medio por medio sin suero e incubamos las células por 24 horas más. Para excluir la posibilidad de que pudiera haber nucleasas en el medio procedentes de lisis celular los cultivos fueron cuidadosamente examinados en el microscopio invertido buscando restos de células. Una

vez verificada su ausencia el medio de cultivo fue colectado y usado inmediatamente en los distintos experimentos.

DNasa I en medio condicionado

Los Western-blots con anticuerpos a-DNasa I sobre muestras de medio de cultivo en volúmenes hasta 100 μ l dieron resultados negativos. Como esto pudo haberse debido a que la enzima estuviese presente en el medio en muy baja concentración, la concentramos por inmunoprecipitación. Partimos de 50 ml de medio de cultivo condicionado, que fueron parcialmente liofilizados de forma de reducir el volumen 5 veces. Posteriormente el medio fue incubado con AbpR durante 12 horas a 4°C, en rotación continua. Los complejos inmunes fueron precipitados por medio de proteína A conjugada a perlas de agarosa. Solubilizamos estos complejos en solución de lisis conteniendo SDS y β -mercaptoetanol. La separación se hizo por electroforesis en geles de poliacrilamida 12%T/0.9%C que fueron electrotransferidos a nitrocelulosa.

Los Western-blots con el suero 2983 purificado por afinidad mostraron la presencia de una proteína de menor movilidad relativa que la enzima pancreática (Figura 44A). Esta diferencia de tamaño era similar a la encontrada entre la enzima pancreática y la presente en células del cristalino y células BEL. Para determinar si la proteína encontrada en el medio extracelular era enzimáticamente activa, realizamos ensayos de actividad usando como sustrato ADN doble cadena de alto peso molecular.

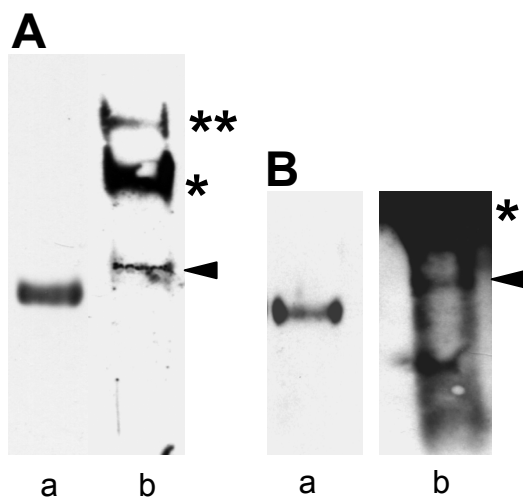


Figura 44. Western-blots de proteínas presentes en medio condicionado por células BEL y suero fetal bovino (inmunoprecipitación: AbpR, inmunodetección: suero 2983 purificado por afinidad). A. a. DNasa I pancreática bovina comercial (50 ng), b. medio de cultivo condicionado. B. a. DNasa I pancreática bovina comercial (50 ng), b. suero fetal bovino. (*) proteína A, (**) cadenas pesadas de inmunoglobulinas. Las puntas de flecha señalan la DNasa I inmunoprecipitada. Gel de poliacrilamida 12%T/0.9%C. Western-blot revelado por quimioluminiscencia.

Actividades nucleasa en medio de cultivo condicionado

Realizamos la puesta a punto del procedimiento experimental con DNasa I pancreática bovina. El ADN fue incubado con distintas cantidades de enzima pancreática (0-10ng) durante 30 minutos a 37°C. Una vez

finalizado el tiempo de incubación, precipitamos el ADN, lo solubilizamos en solución amortiguadora TE a pH 8 y lo sometimos a electroforesis en geles de agarosa 0.8%. Observamos un cambio en el perfil electroforético del ADN tratado con DNasa I respecto al ADN control sin tratar. Este último estaba formado por fragmentos de muy alto peso molecular que prácticamente no salían del pocillo del gel. En las muestras incubadas con 10 ng de DNasa I, no quedó ningún fragmento de ADN lo suficientemente grande como para ser retenido en el gel. En las muestras tratadas con menor cantidad de DNasa I, había “smears” en las regiones correspondientes a fragmentos de 400 a 1000 pbs (ADN tratado con 1 ng de DNasa I) y de 400 a 6000 pbs (ADN tratado con 100 pg de DNasa I) (Figura 45A).

En los experimentos con medio condicionado aumentamos el tiempo de incubación de las muestras con el ADN a 24 horas, ya que la enzima se encontraba en muy baja concentración. En estos experimentos incubamos una cantidad similar de ADN con solución amortiguadora fisiológica (PBS) y con medio de cultivo sin suero sin condicionar como controles. Luego de la incubación a 37°C, el ADN precipitado fue analizado en geles de agarosa 0.8% (Figura 45B).

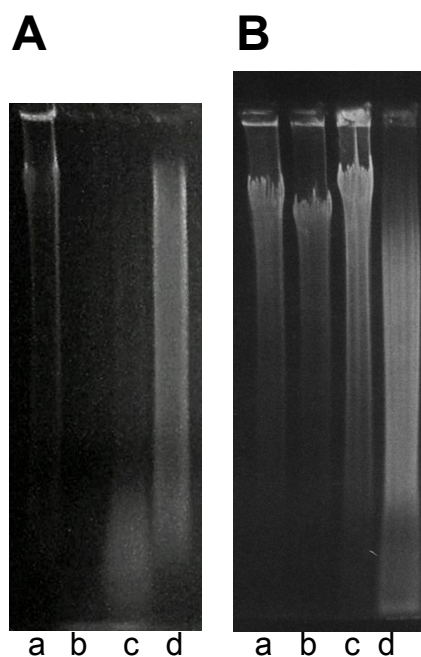


Figura 45. Actividad DNasa I en medio condicionado por células BEL. A. 100 µg de ADN doble cadena de alto peso molecular fueron incubados a 37°C durante 30 minutos con distintas cantidades de DNasa I pancreática bovina comercial, a. 0 ng, b. 10 ng, c. 1 ng, d. 100 pg. B. a. ADN control; 100 µg de ADN doble cadena de alto peso molecular fueron incubados a 37°C durante 24 horas con: b. PBS, c. medio de cultivo sin condicionar, d. medio de cultivo condicionado. Geles de agarosa 0.8%, coloreados con bromuro de etidio.

En todos los geles incorporamos una muestra de la solución de ADN utilizada en las pruebas. Esta solución estaba formada mayoritariamente por fragmentos de gran tamaño, los que formaban una banda no muy bien definida en la región correspondiente a los 6 Kbs. También observamos un “smear” formado por fragmentos cuyos tamaños variaban entre 4 y 6 Kbs (Figura 45B, carril a). El ADN incubado en PBS (Figura 45B, carril b) y

medio de cultivo sin condicionar (figura 45B, carril c), no presentó grandes diferencias respecto al de la solución de ADN. Una banda no muy bien definida, formada por fragmentos de gran tamaño y un “smear” de fragmentos de tamaños diversos, aunque todos superiores a 3 Kbs. El perfil electroforético del ADN en la muestra incubada con medio condicionado por células BEL (Figura 45B, carril d) fue similar al generado por la enzima pancreática (Figura 45A, carril d). Los fragmentos tenían tamaños que variaban entre 500 y 4000 pbs y no observamos ninguna banda en el gel. Por lo tanto el ADN con mayor grado de fragmentación es el que fue incubado con el medio de cultivo condicionado por las células.

El conjunto de resultados obtenidos en los Western-blots y ensayos de actividad muestran que las células BEL secretan DNasa I hacia el medio extracelular y que la misma tiene actividad nucleasa.

7. Glicosilación de la DNasa I sintetizada por células BEL

En todos los experimentos la DNasa I de cristalino siempre presentó un peso molecular superior al de la forma pancreática. Se asemejaría así a la isoforma existente en parótida. El mayor tamaño de esta isoforma se debe exclusivamente al contenido glucosídico presente en la enzima (Abe y Liao, 1983). Pensamos que la diferencia de tamaño molecular aparente entre la enzima cristalina y la pancreática también podría deberse a diferencias en el contenido glucosídico.

En las inmunodetecciones de DNasa I pancreática, de parótida y de células cristalinas en Western-blots, se puso en evidencia que la diferencia de movilidad electroforética entre la enzima pancreática y la presente en los otros dos órganos era idéntica (Figura 46 y 24B). Esto nos llevó a plantear que el mayor tamaño molecular observado en la enzima cristalina también se debiese a un mayor contenido glucosídico. Si este fuese el caso, la completa eliminación de carbohidratos de las enzimas pancreática y cristalina llevaría a la desaparición de la diferencia de movilidad electroforética entre ellas.

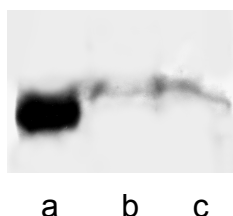


Figura 46. Western-blot de proteínas SDS-solubles de parótida bovina y células BEL. Anticuerpo AbpR. a. DNasa I pancreática bovina comercial (50 ng), b. parótida bovina (30 µg), c. células BEL (≈100 µg). Gel de poliacrilamida 12%T/0.9%C. Western-blot revelado por quimioluminiscencia.

Una forma de eliminar glúcidos asociados a proteínas es mediante tratamiento con enzimas glucolíticas como N-glicosidasa F (PNGasa F) que cliva entre los residuos asparagina y los N-glicanos (Maley et al., 1989). En cada experimento preparamos muestras de DNasa I pancreática y de

células BEL (purificada por inmunoprecipitación a partir de medio condicionado) por duplicado. Todas las muestras fueron preparadas de acuerdo a las condiciones requeridas para el funcionamiento de la glicosidasa. Finalmente agregamos la enzima solo a una muestra de cada DNasa I. Luego de una hora de incubación a 37°C las cuatro muestras fueron preparadas y sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida 12%T/0.9%C. Los geles fueron electrotransferidos a nitrocelulosa y las proteínas inmunodetectadas con el suero 2983 purificado por afinidad (Figura 47).

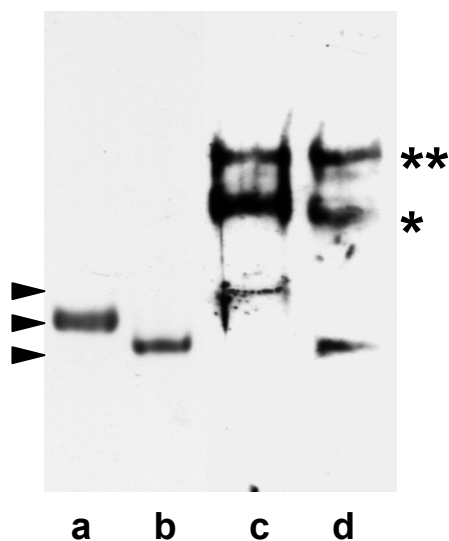


Figura 47. Ensayos de desglicosilación de DNasa I pancreática y cristalínea con la enzima PNGasa F. Western-blot con el suero 2983 purificado por afinidad. a. DNasa I pancreática bovina comercial (40 ng), b. DNasa I pancreática bovina comercial desglicosilada ($\approx$ 40 ng), c. DNasa I secretada por células BEL, d. DNasa I (secretada por células BEL) desglicosilada. (*) proteína A, (**) cadena pesada de las inmunoglobulinas. Gel de poliacrilamida 12%T/0.9%C. Western-blot revelado por quimioluminiscencia. Las puntas de flecha indican las movilidades relativas de DNasa I en función del grado de glicosilación.

En las muestras de DNasa I pancreática observamos que la banda reconocida por el anticuerpo en la muestra desglicosilada era de menor tamaño molecular aparente que la banda reconocida en la muestra sin desglicosilar. En las muestras de DNasa I de células BEL también observamos un cambio en la posición de la banda reconocida por el anticuerpo. La forma desglicosilada tenía mayor movilidad relativa que la enzima glicosilada. Las movilidades electroforéticas de ambas enzimas desglicosiladas eran idénticas (Figura 47, carriles b y d). Estos resultados pusieron en evidencia que la diferencia de tamaño molecular aparente entre la enzima pancreática y la cristalínea se debe exclusivamente al contenido de carbohidratos.

8. Cambios en la distribución de DNasa I durante la degradación nuclear apoptótica inducida por estaurosporina en células BEL

Durante la apoptosis el núcleo celular es desmantelado. La cromatina es condensada y el ADN fragmentado quedando extremos 3'OH libres. La DNasa I cliva el ADN produciendo cortes que exponen extremos 3'OH, y ha sido propuesta como una de las nucleasas apoptóticas. Como esta enzima está presente en el citoplasma de células BEL, nos preguntamos si durante la degradación nuclear apoptótica, era translocada a este organelo.

Inducimos apoptosis tratando cultivos de células BEL con la droga estaurosporina. Esta droga es un metabolito de la bacteria *Streptomyces* que inhibe las proteínas-quinasas en general, al unirse muy cerca del sitio de unión al ATP (Tamaoki et al., 1986). Esta droga induce apoptosis en varios tipos celulares (Nixón et al., 1992; Guma et al., 1992; Rokhlin et al., 1998), incluyendo células BEL (Andersson et al., 2001).

Nuestros experimentos consistieron en sembrar células BEL a baja densidad sobre laminillas de vidrio, luego de 48 horas *in vitro* los cultivos estaban en fase de crecimiento. Transcurrido ese intervalo de tiempo, el medio de cultivo era sustituido por medio de cultivo sin suero conteniendo estaurosporina (1-2 μ M). Los controles fueron cultivos en medio sin suero y sin estaurosporina.

Entre los blancos de las caspasas activadas durante la apoptosis están los componentes del citoesqueleto. Su degradación proteolítica lleva a que las células se retraigan y separen del sustrato. Para determinar el tiempo de incubación con la droga en el que hubiera cambios nucleares, utilizamos, como criterio de eficiencia del tratamiento, que más del 50% de las células exhibieran retracciones citoplásmicas visibles en contraste de fases (entre 6 y 8 horas).

Distribución de la DNasa I durante el proceso apoptótico

Los cultivos tratados con estaurosporina durante 6 horas contenían células sin signos morfológicos de apoptosis y otras en distintas etapas de este proceso. Las últimas eran identificables con facilidad por exhibir distintos grados de retracción citoplásmica así como compactación de la cromatina. En estos cultivos las células presentaron distintos patrones de distribución de la DNasa I. En algunas células la enzima estaba localizada en el citoplasma, acumulada en la región perinuclear (Figura 48B), al igual que en las células de los cultivos no tratados (Figura 48A). En otras células, la DNasa I estaba tanto en citoplasma como en el núcleo, en el que no parecía ubicarse en el territorio nucleolar (Figura 48C). El marcado del ADN de estos núcleos con Hoechst mostró que la cromatina no presentaba signos de compactación (Figura 48D). Fueron muy pocas las células en las que la DNasa I presentaba esta localización, lo que sugiere que esta etapa sea de muy corta duración. La DNasa I apareció también en estructuras membranosas de pequeño tamaño, en las que se acumulaba en sectores generando un patrón en parches (Figura 48E). Estas estructuras serían cuerpos apoptóticos, el estadio final del proceso apoptótico. Por tanto,

luego de la inducción de apoptosis con estaurosporina, una fracción de la DNasa I citoplásmica transloca al interior de los núcleos y más tarde quedaría acumulada en pequeños sectores de los cuerpos apoptóticos.

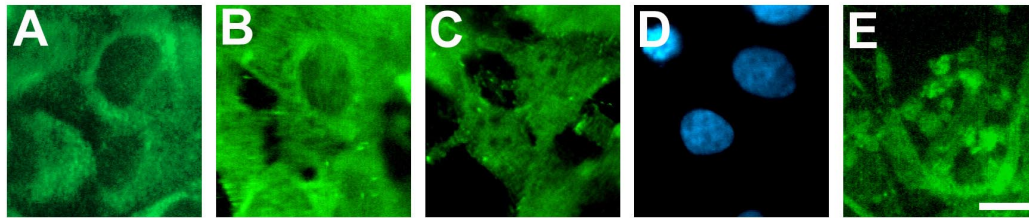


Figura 48. DNasa I en células BEL apoptóticas (inmunodetección: suero 2983 purificado por afinidad). A. células control, B-E. células tratadas con estaurosporina (1 μ M) durante 6 horas, D. Hoechst, C y D son imágenes del mismo campo. Barra: 20 μ m.

Desensamblaje de la lámina nuclear durante la apoptosis

Como mostramos en el capítulo 5 en células BEL la DNasa I está emplazada en el retículo endoplásmico, aparato de Golgi y vesículas por lo que nos cuestionamos sobre el mecanismo de translocación al núcleo celular. El clivaje proteolítico de las laminas y por lo tanto el desensamblaje de la lámina nuclear son un evento temprano en la apoptosis (Oberhammer et al. 1994). La pérdida de integridad de la lámina nuclear podría facilitar la llegada de la DNasa I al interior del núcleo. Para determinar si las laminas eran degradadas durante la apoptosis inducida por estaurosporina en células BEL, estudiamos la distribución de estas proteínas en cultivos control y tratados con la droga.

En todas las células de los cultivos control, las laminas se localizan en la periferia nuclear. La lámina nuclear está intacta ya que no pudimos apreciar ninguna discontinuidad en el característico marcado periférico con los anticuerpos L3f4 (Figura 49A y Figura 50A). Sin embargo, no todas las células de los cultivos tratados con estaurosporina exhiben su lámina nuclear intacta (Figura 49D, puntas de flecha y Figura 50B). El ADN de estas células marcado con Hoechst presenta signos de compactación (Figura 49E, puntas de flecha). La discontinuidad de la lámina nuclear es bien evidenciable en la superposición de las imágenes correspondientes a laminas y ADN (Figura 49F, puntas de flecha). En algunas células había material inmunorreactivo en el citoplasma (Figura 50B, punta de flecha), posiblemente fragmentos de laminas conteniendo el epítopo reconocido por el anticuerpo, resultantes del clivaje de las laminas por parte de proteasas apoptóticas. Estos resultados muestran que durante la apoptosis inducida por estaurosporina en células BEL la lámina nuclear se desensambla siendo éste un evento temprano en la degradación del núcleo que podría facilitar la translocación de la DNasa I al núcleo.

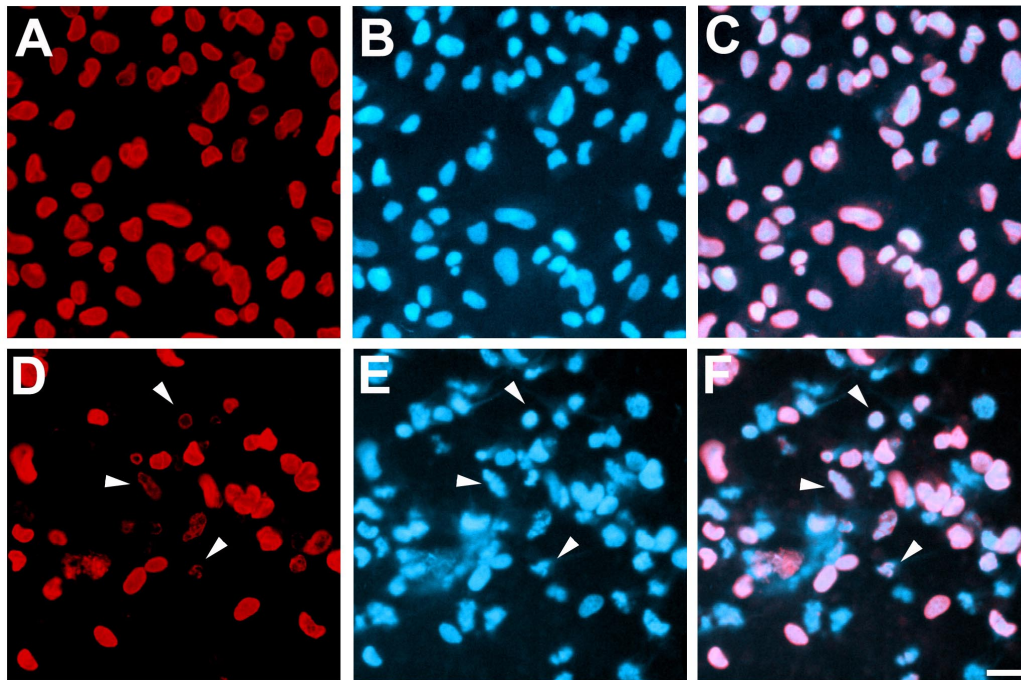


Figura 49. Laminas en células BEL apoptóticas (inmunodetección: L3f4). (A-C) células control, A. laminas, B. Hoechst, C. superposición de las imágenes A y B. (D-F) células tratadas con estaurosporina (1 μ M) durante 6 horas, D. laminas, E. Hoechst, F. superposición de las imágenes D y E. Puntas de flecha: ver texto. Barra: 40 μ m.

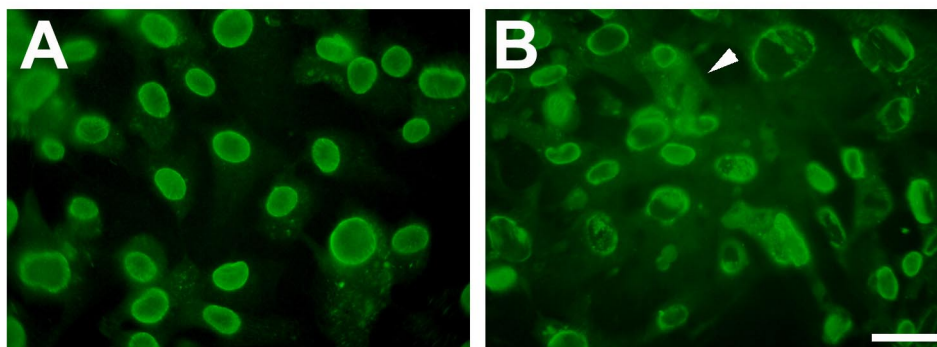


Figura 50. Laminas en células BEL apoptóticas (inmunodetección: L3f4). A. células control, B. células tratadas con estaurosporina (1 μ M) durante 6 horas. Punta de flecha: ver texto. Barra: 45 μ m.

Condensación de la cromatina y fragmentación del ADN

Para evaluar el estado de compactación de la cromatina en células tratadas con estaurosporina durante 6 horas, marcamos el ADN con Hoechst. En un mismo campo encontramos núcleos normales, de cromatina totalmente descondensada, (Figura 51A) así como núcleos con cromatina

con distintos grados de compactación. En núcleos como el de la Figura 51B, observamos numerosas regiones hipercromáticas homogéneas distribuidas en todo el territorio nuclear. En otros núcleos, las regiones muy condensadas presentaban una distribución muy heterogénea (Figura 52F, punta de flecha). En otros núcleos, los parches de cromatina condensada eran menos numerosos y de mayor tamaño (Figura 51C). Estos resultados sugieren el aumento de tamaño de las masas de cromatina condensada al avanzar el proceso apoptótico.

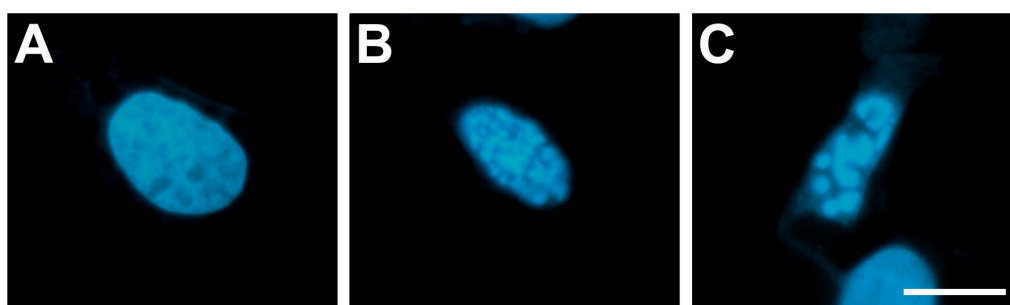


Figura 51. Condensación de la cromatina en células BEL apoptóticas. Células tratadas con estaurosporina (1 μ M) durante 6 horas (ADN marcado con Hoechst). A. núcleo sin cromatina condensada, B. núcleo en las etapas medias de la compactación de la cromatina, C. núcleo en las etapas finales de la compactación de la cromatina. Barra: 25 μ m.

Con el fin de establecer una correlación entre el grado de compactación de la cromatina y la presencia de cortes 3'OH en el ADN, los cultivos control y tratados durante 6 horas con estaurosporina fueron marcados con Hoechst y TUNEL.

En cultivos control ninguna célula resultó TUNEL positiva, poniendo en evidencia que su ADN no poseía cortes 3'OH en cantidades detectables por esta técnica (Figura 52A). Sin embargo esas mismas células, pre-tratadas con 15 U de DNasa I exógena durante 5 minutos, daban una señal TUNEL positiva muy intensa (Figura 52B). En los cultivos tratados con estaurosporina durante 6 horas, algunos núcleos tienen su cromatina totalmente descondensada (Figura 52C, punta de flecha). En estas células el ADN no presenta cortes 3'OH libres en el ADN detectables por TUNEL (Figura 52D, punta de flecha). En núcleos en los que hay una compactación parcial (Figura 52F, punta de flecha), el ADN también aparecía intacto (Figura 52G, punta de flecha). En núcleos en los que la compactación de la cromatina está más avanzada (Figura 52F, flecha; Figura 52C, flecha), los cortes en el ADN aparecen concentrados en sectores de cromatina muy condensada (Figura 52G, flecha; Figura 52D, flecha). Por último, en cuerpos apoptóticos como los que se muestran en la Figura 52 I-K la fragmentación abarca prácticamente todo el ADN. Estos resultados muestran que la

condensación de la cromatina se inicia antes de la aparición de cortes 3'OH en el ADN en cantidades detectables por la técnica TUNEL.

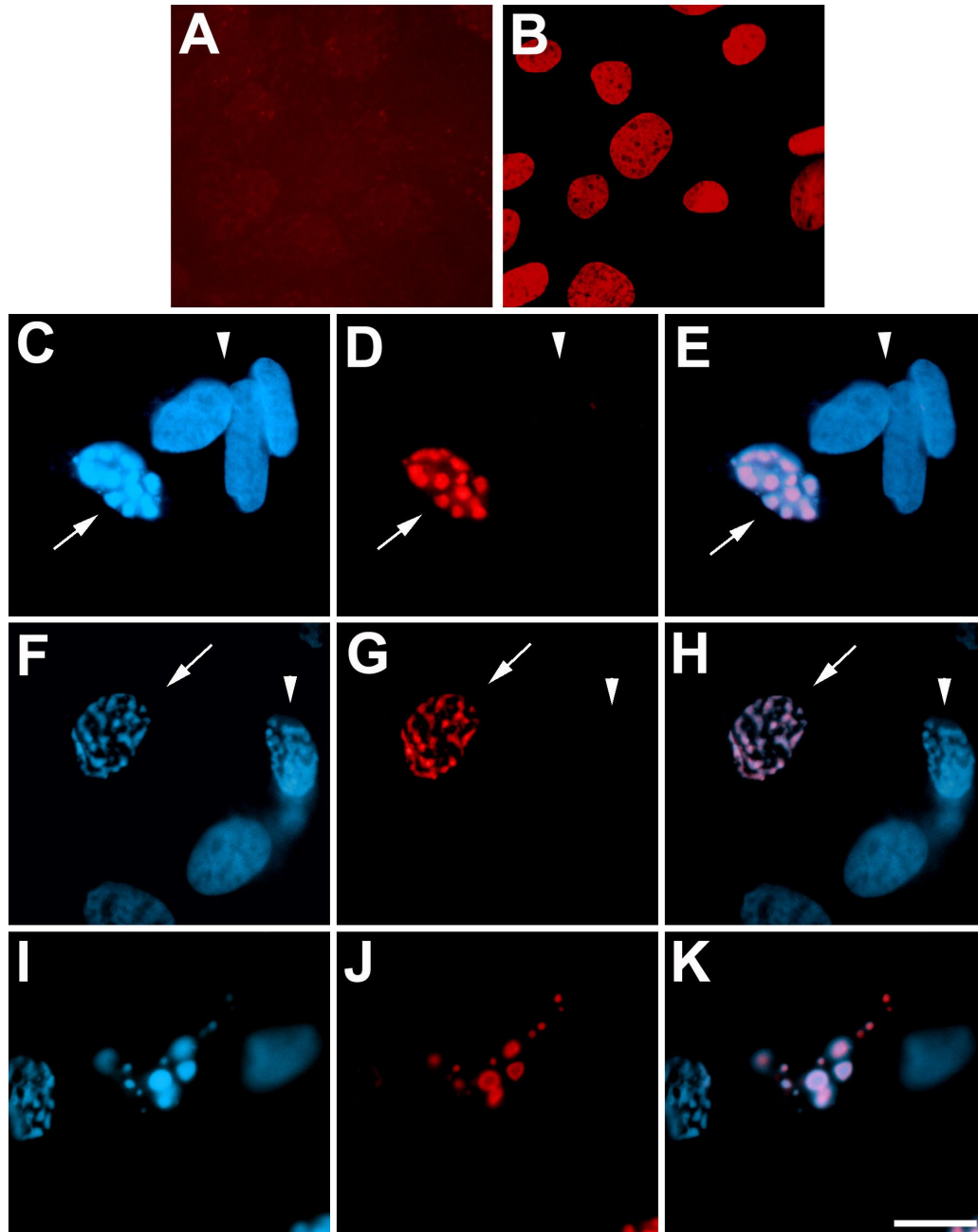


Figura 52. Fragmentación y compactación de la cromatina en células BEL apoptóticas. (A-B) células control, (C-K) células tratadas con estaurosporina (2 μ M) durante 6 horas. A. TUNEL, B. TUNEL, células pre-tratadas con 15U de DNasa I exógena durante 5 minutos. (C, F, I) Hoechst, (D, G, J) TUNEL, E. superposición de las imágenes C y D, H. superposición de las imágenes F y G, K. superposición de las imágenes I y J. Barra: 30 μ m.

Co-distribución de la DNasa I y cortes con extremos 3'OH libres en el ADN

Al haber determinado la translocación de la DNasa I al núcleo así como la aparición de cortes en el ADN con extremos 3'OH libres, estos últimos una vez comenzado el proceso de compactación de la cromatina, buscamos determinar si ambos co-localizaban en algún momento del proceso de degradación del ADN durante la apoptosis.

En algunas células como la que se muestra en la Figura 53A, la retracción citoplásmica no se ha completado y la DNasa I está presente tanto en el citoplasma como en el núcleo. El núcleo de esta célula presenta parches de cromatina condensada TUNEL positivos (Figura 53B) y la DNasa I está homogéneamente distribuida en todo el núcleo (Figura 53A). En células muy retraídas, en las que no hay citoplasma visible, los parches de DNasa I son más grandes (Figura 53D), en su núcleo la señal correspondiente a TUNEL también está distribuida en parches (Figura 53E), algunos de los cuales co-localizan con parches de DNasa I (Figura 53F). En células esféricas o sensiblemente esféricas que pueden considerarse en el final de la degradación nuclear, los parches de DNasa I son aún más grandes (Figura 53G y J) y todas las regiones TUNEL positivas (Figura 53H y K, respectivamente) coinciden con parches de DNasa I (Figura 53I y L, respectivamente).

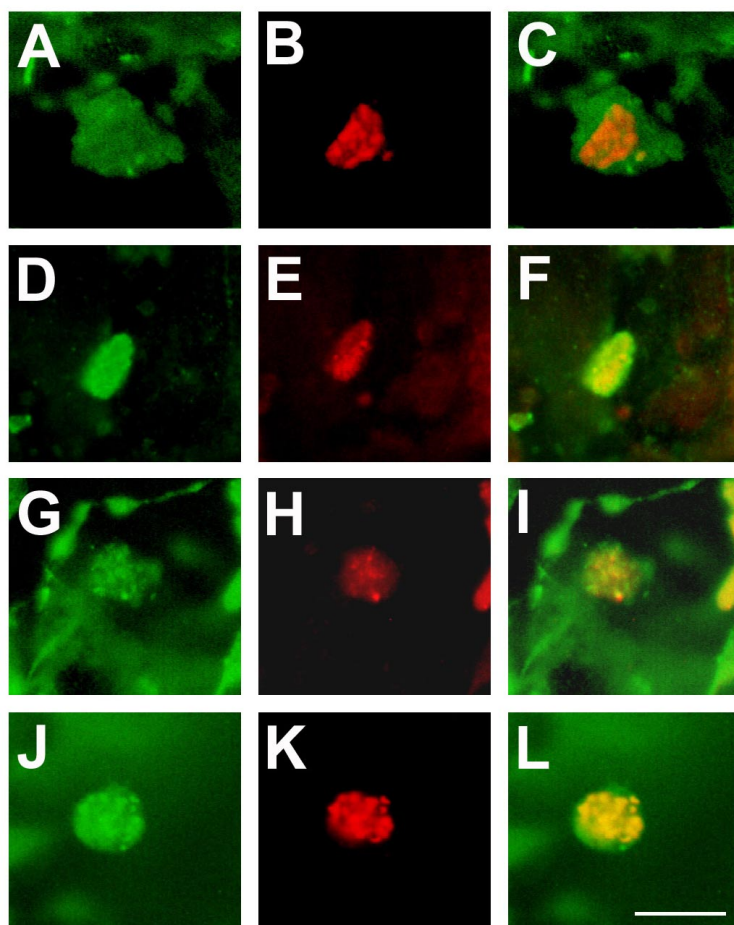


Figura 53. DNasa I y cortes 3'OH libres en el ADN en células BEL apoptóticas (inmuno-detección: suero 2983 purificado por afinidad, cortes 3'OH libres: TUNEL). Las células fueron tratadas con estaurosporina (2 μ M) durante 6 horas. (A, D, G, J) DNasa I, (B, E, H, K) TUNEL, C. superposición de las imágenes A y B, F. superposición de las imágenes D y E, I. superposición de las imágenes G y H, L. superposición de las imágenes J y K. Barra: 25 μ m.

Estos resultados evidencian que la DNasa I sólo co-localiza con ADN fragmentado en regiones de cromatina muy condensada y sugieren que esta enzima actuaría fundamentalmente en las etapas finales de la degradación del ADN.

III. DISCUSIÓN

Los ARN mensajeros de la DNasa I están presentes en células del cristalino

Nuestros resultados muestran que las células epiteliales del cristalino bovino adulto *in vitro* e *in vivo* expresan ARN mensajeros que codifican DNasa I. Se han encontrado ARN mensajeros de esta enzima en una gran variedad de tejidos en distintas especies. Estos transcriptos están presentes en células de órganos del sistema digestivo como páncreas, parótida, estómago e intestino delgado, pero también en tejidos no digestivos como timo, riñón, oviducto y pituitaria (Peitsch et al., 1993; Yasuda et al., 1997; Shimada et al., 1998a; Shimada et al., 1998b; Nakashima et al., 1999).

Nuestros resultados son los primeros que muestran la existencia de ARN mensajeros para DNasa I en el cristalino. En efecto, hay un artículo de Hess y FitzGerald (1996) en el que se plantea que estos transcriptos no existen en el cristalino de ratón. Al ser éste el único reporte al respecto, en todas las publicaciones referentes a este órgano se ha excluido a la DNasa I como una de las nucleasas presentes en el mismo. Estos autores buscaron los ARN mensajeros para DNasa I mediante Northern-blot y RT-PCR. Si bien no podemos descartar la posibilidad de que en el cristalino de ratón la DNasa I no esté presente, es probable que los resultados negativos obtenidos por ellos tengan otras causas. En una primera instancia debemos considerar las células de las cuales extrajeron el ARN: la purificación fue realizada a partir de fibras corticales luego de decapsular los cristalinos. Al realizar esta maniobra eliminaron las células epiteliales y posiblemente parte de las protofibras, ambos tipos celulares que exhiben las más altas tasas de síntesis de ARN (Modak y Persons, 1971). En ambas aproximaciones experimentales como control positivo buscaron la presencia de transcriptos de CP49. Esta proteína, integrante de una forma de filamentos intermedios característicos del cristalino, sólo se expresa en las células fibra. Es posible, entonces, que en las preparaciones de ARN de estos autores el mensajero de esta proteína esté mucho más representado que el de la DNasa I y que por lo tanto no sea un control adecuado.

En nuestros experimentos de amplificación del ARN mensajero de DNasa I por RT-PCR, utilizamos como control positivo aldolasa, una enzima de mantenimiento presente en todos los tipos celulares. Para obtener bandas de amplificación en cantidades relativamente equivalentes para ambos transcriptos, en células BEL y epiteliales debimos utilizar 250 veces más ADNc en las amplificaciones para DNasa I. Estos resultados sugieren que el ARN mensajero de la DNasa I se encuentra en un muy bajo número de copias en el cristalino, lo que podría explicar los resultados negativos de Hess y FitzGerald. En nuestro conocimiento hasta el momento no se ha estudiado la vida media del ARN mensajero de DNasa I en ningún tipo celular, por lo que se debe tener en cuenta la posibilidad de que en el cristalino estos transcriptos tengan vida media corta o que sean específicamente degradados en las fibras.

Los únicos datos cuantitativos respecto a la expresión de transcritos de DNasa I fueron obtenidos en tejidos de conejo mediante técnicas de PCR competitivo. Los más altos niveles de transcripción fueron encontrados en páncreas y parótida en donde además se detectó la actividad enzimática más alta. En otros tejidos como riñón, hígado, intestino, estómago y timo, la cantidad de transcritos era inferior, al igual que los niveles de actividad DNasa I encontrados. Estos resultados pusieron en evidencia que la expresión génica de la DNasa I es dependiente del tipo celular y permitieron establecer una correlación entre los niveles de actividad enzimática y la tasa de transcripción del gen (Yasuda et al., 1997).

Hasta el presente el único factor regulador de la expresión descrito para este gen es la somatostatina, que induce una disminución de los niveles de su transcripción. Pero no todos los tejidos responden a la somatostatina, el tratamiento con inyección intraperitoneal afecta la actividad DNasa I en el suero, estómago, pituitaria e intestino delgado pero no en parótida, hígado y riñón. Los niveles de transcritos codificantes para DNasa I fueron determinados en intestino delgado y parótida de animales tratados y control. La disminución de los transcritos solo ocurre en muestras de intestino delgado (más del 50%) de animales tratados (Yasuda et al., 2001). La vía de señalización de la somatostatina involucra la activación de proteínas G que disminuirían la concentración de AMPc y calcio intracelulares (Schonbrunn, 1990). En las regiones 5' no codificantes de rata (Yasuda et al., 2001) y humano (Yasuda et al., 1995) se describió la presencia de secuencias consenso a las que se uniría un elemento de respuesta al AMPc, lo que podría explicar los efectos inhibitorios de la somatostatina sobre la expresión génica de la DNasa I. Como el gen de la DNasa I está presente en copia única en ambas especies, la capacidad de respuesta de los tejidos sería dependiente de la presencia del receptor (incluyendo el tipo de receptor) para la somatostatina en las células.

La región 5' no codificante del gen de la DNasa I mejor conocida es la del humano. Se han descrito secuencias consenso para otros elementos de regulación de expresión génica como Pan-1, correspondiente a factores activadores pancreáticos (Meister et al., 1989) y un elemento de respuesta a glucocorticoides (Scheredeit et al., 1983). Será importante en el futuro determinar los factores capaces de afectar la expresión de la DNasa I en el cristalino y en particular si en las células epiteliales existen receptores de somatostatina, ya que, como dijimos anteriormente, el ARN mensajero de la DNasa I podría encontrarse en un muy bajo número de copias.

En el transcurso de nuestros experimentos de RT-PCR encontramos tres fragmentos de amplificación de menor tamaño que el correspondiente al transcripto completo. Uno de ellos ya fue secuenciado y resultó una forma de "splicing" alternativo, en el que se había eliminado casi por completo el exón 5. La existencia de formas de "splicing" para los ARN mensajeros de DNasa I había sido mostrada en cerebro, hígado y timo de rata por Sikorska y colaboradores mediante Northern-blot y RT-PCR (Liu et al., 1997). Estos autores encontraron más de 20 transcritos diferentes,

cuyos tamaños variaban entre 300 y 1900 pares de bases. Los transcriptos que estos autores secuenciaron eran resultado de la inserción total o parcial de intrones y/o de la delección total o parcial de exones. Incluso en uno de ellos se habían conservado todos los intrones. Posiblemente transcriptos similares hayan sido los detectados por Hess y FitzGerald en los Northern-blots realizados en muestras de ARN de riñón, teniendo en cuenta que la banda obtenida fue de 1.6-1.8 Kbs. Sin embargo, realizando técnicas similares, otros autores encontraron una banda única correspondiente al ARN mensajero maduro en próstata (Rauch et al., 1997), musculo esquelético, intestino, parótida y riñón (Polzar et al., 1994) a pesar de haber usado 5 veces más ARN poli-A que Sikorska. En otros de los transcriptos secuenciados por Sikorska, el "splicing" produce cambios en la secuencia nucleotídica que afectan al transcripto antes del exón 6. Es en este exón donde está codificada la histidina 156, residuo clave para la formación del sitio activo de la enzima. Por lo tanto, ninguna de estas variantes de mensajero produciría una enzima activa. Nuestros resultados serían los primeros en confirmar los hallazgos de Sikorska en cuanto a la existencia de formas de "splicing" alternativo en las que han sido eliminadas regiones codificantes. El evento de "splicing" que eliminó el exón 5 del fragmento de 800 pbs no incluyó el primer nucleótido del exón ni el último del intrón correspondiente. En consecuencia, a partir de la posición 284 del transcripto se produce un cambio en el marco de lectura que lleva a que los aminoácidos codificados por los siguientes codones no correspondan a la DNasa I y que en la posición 339-341 aparezca un codón de terminación (tga). Por lo tanto este transcripto produciría una DNasa I trunca, a la que le faltarían los últimos dos tercios de la proteína incluyendo el sitio activo.

A pesar de que no realizamos experimentos que nos permitieran determinar si el transcripto de 800 pbs era traducido, en ninguno de los Western-blots realizados obtuvimos bandas positivas en la región correspondiente al tamaño esperado (10-15 Kda). Estos resultados coinciden con los de Sikorska quien tampoco detectó ninguna proteína de menor tamaño en Western-blots con anticuerpos anti-DNasa I. La existencia de formas fragmentadas de ARN mensajeros que no dan lugar a proteínas funcionales, ha sido encontrada para varias proteínas, entre ellas alfa-hidroxilasa 17 (Sanne et al., 1995), DT-diaforasa (Yao et al., 1996) y p53. En esta última se mostró la existencia de transcriptos con la inserción de parte de uno de los intrones, esto determinaría la formación de una proteína no funcional que carecería de los dominios de tetramerización y unión al ADN. Es interesante señalar que estos transcriptos están presentes en cantidades significativas solo en células quiescentes (Flaman et al., 1996).

En células en las que la DNasa I se expresa en forma constitutiva, entre las que se incluirían las células epiteliales del cristalino como muestran nuestros resultados, la disminución del ARN mensajero completo para la enzima podría tener otra consecuencia. La sobre-expresión de DNasa I en células COS-1 lleva a que cierto número de éstas, muera (Polzar et al., 1993). Por lo tanto la generación de múltiples formas de "splicing"

alternativo, que lleva a la disminución del transcripto que codifica para la enzima funcional, podría estar vinculada a los mecanismos de mantenimiento de la sobrevivencia celular. Será importante analizar en el futuro la posibilidad de que el tipo y frecuencia de los eventos de “splicing” sea tejido-específico y refleje la secreción de la DNasa I al medio extracelular por parte de las células.

Organización del gen de la DNasa I bovina

La comparación de la secuencia del ARN mensajero y la obtenida a partir del ADN genómico indica que la región codificante del gen de la DNasa I bovina está organizada en 8 exones y 7 intrones. Todas las regiones límite intrón-exón (AG/GT) siguen la regla de Mount (1982), al igual que en el gen de la DNasa I humana (Yasuda et al., 1995). Los exones son relativamente pequeños, el largo promedio, 115 pares de bases, es similar al descrito en los genes humanos (178 pares de bases) (Alberts, et al., 2002). Esta organización es similar a la encontrada en los genes de DNasa I de ratón (Peitsch et al., 1995), rata (Liu et al., 1997) y humano (Yamada et al., 1995). Tenemos pendiente determinar la secuencia del exón 1 y la región no codificante del exón 9 para completar el conocimiento de estas regiones.

El análisis de la secuencia aminoacídica y génica de la DNasa I bovina nos permitió ubicar aminoácidos específicos en los distintos exones. Los aminoácidos que forman el péptido señal están codificados al inicio del exón II, los que forman parte del sitio activo: ácido glutámico 100, histidina 156, ácido aspártico 234 e histidina 274 están ubicados en los exones IV, VI, VII y IX respectivamente. La actividad e integridad estructural de la DNasa I son dependientes de la unión de dos iones calcio. Los aminoácidos que forman el sitio I están codificados en el exón VII y los del sitio II en el exón V. Los residuos aminoacídicos involucrados en la interacción con la actina: ácido glutámico 35, tirosina 87 y las valinas 88 y 89 están codificadas en los exones III y IV respectivamente. Los codones que codifican todos esos aminoácidos están presentes en los mismos exones en las cuatro especies de las cuales es conocida la secuencia génica.

La existencia de isoformas de DNasa I bovina que difieren en un aminoácido es conocida desde hace muchos años. La isoforma A posee una histidina en la posición 143 que cambia por una prolina en la isoforma C (Salnikow y Murphy, 1973). Esta histidina es codificada por el codón CAC ubicado en la posición 1183-1185 de la secuencia génica (Genbank AF528509). Como hasta esta Tesis no se había determinado la secuencia génica de la DNasa I bovina, no se conoce el evento o eventos mutacionales que llevaron al cambio aminoacídico en esta proteína. Teniendo en cuenta que los codones que codifican para prolina son CCA, CCC, CCG y CCT, una mutación puntual que lleve a que la adenina 1184 cambie por una citosina sería suficiente para que se produzca el cambio en el polipéptido.

La comparación de niveles de actividad DNasa I en suero, orina, riñón e intestino así como de ARN mensajeros en parótida, riñón e intestino de ratones *DNasaI⁺/DNasaI⁺*, *DNasaI⁺/DNasaI⁻* y *DNasaI⁻/DNasaI⁻* indica que los niveles de expresión de la enzima dependen de ambos alelos

(Napirei et al., 2000). La secuencia del ARN mensajero de DNasa I en células BEL corresponde a la isoforma A pero no podemos descartar la posibilidad de que existan transcriptos que codifiquen para la forma C. La concentración relativa de las isoformas A y C solo ha sido estudiada en el páncreas, donde la isoforma A es la más abundante. Sería interesante ampliar estos estudios a otros tejidos, incluyendo el análisis de los transcriptos, para determinar si en animales heterocigotas el uso de los alelos cambia en función del tipo celular en el que se exprese la proteína. La posición 143 está ocupada por un residuo histidina únicamente en bovinos, en humanos esa posición la ocupa una arginina. En ratón, rata, conejo, cerdo, oveja, pollo y elafe el residuo aminoacídico es una prolina. Teniendo en cuenta, entonces, que la prolina es el aminoácido presente en la mayoría de las especies, es tentador pensar en la posibilidad de que la forma ancestral de la enzima posea una prolina. En ese caso la isoforma C, menos abundante, en bovinos representaría la forma ancestral desde el punto de vista evolutivo.

DNasa I en células del cristalino

Para determinar la presencia de actividades enzimáticas similares a la DNasa I usamos zimogramas de nucleasas. Esta técnica, desarrollada por Rosenthal y Lacks (1977) consiste en separar mezclas complejas de proteínas en geles SDS-PAGE conteniendo ADN doble cadena de alto peso molecular incluido en la matriz del gel. Una vez renaturalizadas las nucleasas degradan el ADN del gel en la región donde están localizadas. Luego de la coloración las bandas de actividad nucleasa se identifican en el gel como bandas claras, de las cuales se podrá determinar su peso molecular aparente. Otra ventaja de este método es que las corridas electroforéticas se realizan en condiciones desnaturalizantes, por lo tanto las nucleasas pueden estar separadas de posibles inhibidores.

Los resultados que obtuvimos en los zimogramas muestran la presencia de varias bandas de actividad nucleasa en células epiteliales, fibras corticales y nucleares de cristalino bovino adulto. Para identificar las bandas claras como resultados de una degradación por nucleasas es menester excluir la posibilidad de que alguna se trate de una proteína que renaturalizada se una al ADN interfiriendo con la fijación del Azul de Toluidina al mismo, fenómeno descrito con las histonas (Baxter et al., 1989). Descartamos la posibilidad de que fueran histonas ya que todas las bandas eran de mayor peso molecular que esas proteínas. Por otra parte, teniendo en cuenta la forma de haltera de las bandas, característica de las nucleasas, y la formación de una zona oscura en los bordes de las mismas, donde hemos mostrado que existen cortes de cadena simple (Arruti et al., 1995), creemos que todas las bandas observadas corresponden a zonas de actividad nucleasa *bona fide*.

En todas las muestras está presente una banda de tamaño similar al de la enzima pancreática. La diversidad de bandas detectadas en las muestras podría deberse a la presencia de otras nucleasas, diferentes a la DNasa I,

pero como ella calcio⁺⁺-magnesio⁺⁺ dependientes. Sin embargo no podemos dejar de considerar la posibilidad de que alguna de ellas sea una forma dimérica de la DNasa I o la propia enzima asociada a fragmentos de ADN que hayan enlentecido su migración. Para identificar la banda correspondiente a DNasa I usamos anticuerpos anti-DNasa I de origen comercial (AbpR) y otros preparados por nosotros (suero 2983). El anticuerpo AbpR reconoce más de una banda en extractos de proteínas de páncreas bovino, incluyendo la carboxipeptidasa A (De María, resultados no publicados). El suero 2983 purificado por afinidad reconoce en cambio, una única banda de tamaño molecular similar al de la DNasa I pancreática. En muestras de células epiteliales y fibras corticales de cristalino bovino, el suero 2983 purificado por afinidad reconoció una banda de peso molecular muy parecido al de la enzima pancreática. Debemos mencionar que en las fibras este suero reconoció además otra banda de mayor tamaño que aún no hemos identificado. Considerando que el suero fue purificado por afinidad en una columna de DNasa I pancreática bovina, creemos que la proteína presente en esa banda debe compartir determinantes antigénicos con la DNasa I. Los patrones de inmunolocalización *in situ* del suero 2983 purificado por afinidad y del AbpR en cortes de cristalino y células BEL (que discutiremos más adelante) fueron siempre similares. Es probable, entonces, que en el cristalino bovino la carboxipeptidasa A, esté en muy baja cantidad en caso de estar presente. En conjunto, los resultados obtenidos en los zimogramas y Western-blots muestran que la DNasa I está presente en epitelio y fibras del cristalino bovino. Queremos destacar que además de ser éste el primer reporte de la presencia de esta enzima en el cristalino, es el primero en el que se analizan subpoblaciones celulares con estados funcionales diferentes de un mismo tipo celular.

Mediante técnicas similares a las usadas por nosotros, la DNasa I ha sido encontrada en otros tejidos bovinos: páncreas, parótida, riñón e hígado (Lacks, 1981; Takeshita et al., 2001; Nishikawa y Mizuno, 2001). En otros animales se la detectó además en pituitaria, próstata, estómago y timo (Lacks, 1981; Rauch et al., 1997; Yasuda et al., 1997; Shimada et al., 1998b). En estos tejidos la cantidad de DNasa I presente es muy distinta; páncreas y parótida son los órganos que siempre presentan los más altos niveles de actividad. Analizando estos tejidos en 6 especies de mamífero, se propuso clasificar a la enzima en tres tipos: tipo páncreas, tipo parótida y tipo páncreas-parótida, en base a las distintas concentraciones tisulares. De acuerdo a esta clasificación las enzimas de humano y cerdo son tipo páncreas, las de rata y ratón tipo parótida y las de bovino y cerdo tipo páncreas-parótida (Takeshita et al., 2000).

En el cristalino han sido descritas diversas actividades nucleasas, las que fueron clasificadas de acuerdo a los requerimientos iónicos y de pH para su funcionamiento. Anteriormente habíamos reportado la presencia de actividades nucleasa tipo DNasa I de 30 y 60 Kda de peso molecular aparente en fibras de cristalino de pollo postnatal (Arruti et al., 1995). Counis y colaboradores reportaron que el anticuerpo AbpR reconoce

bandas de 18, 60 y 32 Kda en fibras de cristalino de pollo embrionario (Torriglia et al., 1995). Las primeras podrían tratarse de una forma de degradación y dímeros de la DNasa I respectivamente, detectados por ellos al haber usado grandes cantidades de proteínas totales. También se describió la presencia de una nucleasa catión independiente, similar a la DNasa II lisosomal, L-DNasa II, tanto en epitelio como fibras del cristalino de embrión de pollo (Torriglia et al., 1995). En ese trabajo sin embargo no se analizaron distintas poblaciones de fibras y tampoco se especifica la región de fibras utilizada para el estudio de localización *in situ*.

Localización de la DNasa I en células del cristalino

Durante la diferenciación de las fibras la degradación del núcleo es uno de los eventos característicos. En este proceso el ADN es clivado hasta fragmentos oligonucleosómicos. Durante el transcurso de este último proceso se han detectado cortes 3'OH libres en el ADN mediante la técnica TUNEL. La enzima DNasa I era considerada como una de las candidatas ha estar involucrada en la fragmentación del ADN hasta el trabajo de Hess y FitzGerald (1996) quienes, como ya dijimos, no pudieron detectar los transcriptos de esta enzima en el cristalino de ratón (Bassnett y Mataic, 1997; Bassnett, 2002). Sin embargo, al haber demostrado la presencia de la DNasa I en células epiteliales y fibras del cristalino bovino, reconsideramos la posibilidad de que esta enzima estuviese involucrada en la fragmentación del ADN durante la diferenciación de las fibras. Por lo tanto realizamos el estudio de la distribución de esta enzima en las distintas poblaciones celulares del cristalino.

Los experimentos de inmunolocalización *in situ* muestran que la DNasa I está presente en el citoplasma de células epiteliales del cristalino. Analizamos células del epitelio central y del periférico, en el último la DNasa I se acumula en regiones adyacentes al núcleo, una localización similar a la descrita para el aparato de Golgi y retículo endoplásmico en estas células (Bassnett, 1995). Estos resultados son contradictorios con los presentados por Counis quien encontró que el anticuerpo AbpR marcaba los núcleos de células epiteliales de cristalino de embrión de pollo (Torriglia et al., 1995). La diferencia entre nuestros resultados y los de Counis podría deberse a particularidades especie-específicas, a la edad de los animales, o a diferencias en el protocolo de inmunolocalización. Descartamos que se deba a singularidades del anticuerpo ya que en algunos experimentos usamos uno del mismo origen (AbpR).

En las fibras, la DNasa I se encuentra localizada tanto en el citoplasma como en el núcleo, cambiando el patrón de distribución en este organelo al avanzar el proceso de diferenciación de las células. Para correlacionar los distintos patrones de distribución de DNasa I con diferentes subpoblaciones de fibras tuvimos en cuenta la localización topográfica de éstas así como la forma de sus núcleos. La acumulación perinuclear de la DNasa I observada en el epitelio periférico se acentúa en las protofibras. Si la DNasa I está emplazada en el retículo endoplásmico

como sugieren nuestros resultados, la detección de la enzima en la región adyacente al núcleo podría ser consecuencia de cambios en el retículo endoplásmico. Durante el proceso de diferenciación de las fibras el retículo endoplásmico se disgrega ubicándose en toda la célula, sin embargo un conjunto de cisternas permanece en estrecha asociación con la cisterna perinuclear (Bassnett, 1995). Es posible que la DNasa I esté localizada en esos remanentes de retículo endoplásmico y en la cisterna perinuclear con la que el retículo tiene continuidad topológica. Las inmunodetecciones de DNasa I en las distintas poblaciones de fibras corticales muestran que una fracción de la población de moléculas de DNasa I permanece en la periferia nuclear, posiblemente en la cisterna perinuclear, inclusive en núcleos que están colapsando. Sin embargo existen singularidades en el patrón de marcado de los anticuerpos anti-DNasa I en la periferia nuclear de las distintas fibras. En núcleos colapsados, observamos zonas de concentración de DNasa I que coincidían con regiones de cromatina condensada. Esto sugería que una fracción de la enzima translocaba desde la periferia nuclear, sea desde el retículo endoplásmico o desde la cisterna perinuclear, hacia el interior del núcleo. Efectivamente esto fue confirmado en núcleos redondos de fibras profundas mediante microscopía confocal. Los resultados presentados por Counis solo muestran la presencia de DNasa I en núcleos elípticos (que de acuerdo a las imágenes publicadas corresponderían a fibras corticales medias) en el cristalino de pollo embrionario (Torriglia et al., 1995). En este trabajo de Tesis por primera vez se brinda una precisa descripción del patrón de distribución de una nucleasa en el cristalino.

Nuestro trabajo indica que la desintegración de la lámina nuclear comienza en núcleos elípticos, con cromatina parcialmente condensada, de fibras corticales profundas. Se han descrito resultados similares en pollo y en bovino (Bassnett y Mataic, 1997; Dahm et al., 1998). En el pollo, la degradación de la lámina nuclear comenzaría en núcleos elípticos antes del colapso nuclear. La lámina no se perdería por completo ya que restos de la misma son detectados en los remanentes nucleares. De acuerdo a los resultados de Dahm y colaboradores (1998), las perforaciones en la lámina nuclear comenzarían en núcleos que están empezando a redondearse. Estos resultados indican que la degradación de la lámina nuclear es un evento temprano en la degradación de los núcleos fibrilares, que comenzaría antes de que aparezcan grandes acúmulos de cromatina condensada.

Las inmunodetecciones con el anticuerpo L3f4 mostraron que las laminas no están presentes en núcleos totalmente colapsados o remanentes nucleares. Esto plantea una diferencia con los resultados publicados por Dahm quien detectó laminas en estos núcleos (Dham et al., 1998). Una posible explicación para esta discrepancia sería que en estos núcleos solo estén presentes fragmentos de laminas, no reconocibles por el anticuerpo monoclonal utilizado por nosotros. Muy recientemente la degradación de la envoltura nuclear fue estudiada analizando cambios en la distribución de los complejos de poro. Los mismos comienzan a agruparse en sectores

discretos de la envoltura nuclear al mismo tiempo que comienzan a aparecer las perforaciones en la lámina nuclear (Dahm y Prescott, 2002). Nuestros resultados con la sonda lipofílica DiOC₆ sugieren que la envoltura nuclear de núcleos redondeados presenta discontinuidades, al igual que en el cristalino de pollo (Bassnett y Mataic, 1997). La DNasa I translocaría al interior de núcleos redondeados en los que la envoltura nuclear ha perdido su integridad.

Hasta el momento no se ha determinado el o los factores desencadenantes de la degradación nuclear, así como tampoco el mecanismo por el cual la lámina nuclear es degradada. Sin embargo evidencias experimentales apuntan hacia dos posibles mecanismos: la degradación mediada por caspasas o un desensamblaje por fosforilación mediada por el complejo ciclinaB/cdc2. La presencia de las caspasas 1, 2, 3, 4 y 6 fue demostrada en fibras de cristalinos de embrión de pollo (E16) en los que ya comenzó la degradación de organelos pero no en cristalinos de embriones más jóvenes (E8). En este trabajo las laminas no fueron analizadas, pero sí otros blancos de las caspasas, cuya degradación demostró que estas enzimas estaban activas (Wride et al., 1999). También fueron encontradas caspasas activas en cristalinos de embrión de rata (Ishizaki et al., 1998). El complejo ciclinaB/cdc2 está presente en cristalinos de embrión de pollo (E15) en regiones en las que se está llevando a cabo la degradación de la envoltura nuclear y la cromatina se está condensando (Gao et al., 1995; He et al., 1998). No podemos dejar de considerar la posibilidad de que otras proteasas estén también involucradas en la degradación de las laminas y de otros componentes de la envoltura nuclear.

El conjunto de nuestros resultados y los ya publicados (Bassnett y Mataic, 1997; Dahm et al., 1998) indican que la degradación de la lámina nuclear es un evento temprano del proceso de degradación nuclear de las fibras. Esto permitiría el ingreso de proteínas citoplásmicas al núcleo. Un evento de este tipo ya había sido mostrado para CP49, que está en el interior de núcleos colapsados (Sandilands et al., 1995).

La DNasa I corta el ADN dejando extremos 3'OH, detectables mediante la técnica TUNEL. La acumulación de cortes 3'OH libres comenzaría después del inicio de la degradación de las laminas y por lo tanto después que la DNasa I ha tenido acceso al ADN. Esto apoyaría los resultados planteados por Bassnett y Mataic (1997), quienes proponen que la aparición de ese tipo de corte en el ADN es un evento tardío, que ocurre después de la degradación de la envoltura nuclear. Sin embargo, nosotros ya detectamos fragmentación del ADN inclusive en núcleos no colapsados en los que se observan acúmulos de cromatina condensada, y no solamente en núcleos totalmente colapsados (Bassnett y Mataic, 1997). Nuestros resultados, similares a los descritos en bovinos (Dahm et al., 1998), indican que el proceso de fragmentación del ADN detectable por la técnica TUNEL, comienza, en el bovino adulto, en etapas un poco más tempranas de la diferenciación de las fibras que las propuestas en el embrión de pollo (Bassnett y Mataic, 1997). Es posible que estas diferencias se deban a

diferencias en los protocolos experimentales, a características especie-específicas o a las edades de los cristalinos estudiados.

La cronología de los siguientes eventos: inicio de la desintegración de la envoltura nuclear, ingreso de la DNasa I al núcleo y aparición de cortes 3'OH libres en el ADN, nos lleva a plantear la posibilidad de que la DNasa I sea una de las enzimas responsables de realizar dicho tipo de corte, en las etapas tardías de la fragmentación del ADN. Posiblemente otras nucleasas están involucradas, entre ellas el factor de fragmentación de ADN (DFF). Este factor, una de las nucleasas apoptóticas, existe en el cristalino de pollo, tanto en el epitelio como en las fibras ubicadas hacia la periferia del cristalino (Wride et al., 1999). El fragmento activo de este factor (30Kda) ha sido detectado en las fibras de cristalino de embrión de pollo a partir del día 12 del desarrollo, momento en que se inicia la degradación de los organelos. Otra nucleasa detectada en el cristalino es la L-DNasa II, localizada en los núcleos de fibras corticales. A pesar de que esta enzima no genera cortes 3'OH libres en el ADN debemos considerarla teniendo en cuenta su localización pero, en tal caso habría que postular la existencia de fosfatasas que clivaran los extremos 3'P (Torriglia et al., 1995).

En las fibras, concentramos nuestra atención en el análisis de la DNasa I en relación al núcleo celular. Sin embargo esta enzima también está presente en el citoplasma cortical de las fibras. Este tema será abordado experimentalmente en el futuro, pero debemos mencionar la posibilidad de que la enzima esté ubicada en remanentes del aparato de Golgi, los que han sido localizados en dicha región celular en fibras en diferenciación de cristalinos de pollo embrionarios (Bassnett, 1995).

Localización de la DNasa I en células BEL

Los resultados obtenidos mediante zimogramas de nucleasas y Western-blots mostraron que la DNasa I también está presente en células BEL, incluso después de más de 20 ciclos celulares. Esta sería la primera vez en la que se describe en detalle la distribución subcelular de la DNasa I en células *in vitro*. La distribución de la DNasa I ha sido estudiada en la gran mayoría de los casos en tejidos y no en células *in vitro*. El análisis más detallado fue realizado en células COS transfectadas con un vector de expresión para la DNasa I en las que la DNasa I se localiza en los organelos de la vía de secreción de proteínas (Polzar et al., 1993). En fibroblastos en cultivo la DNasa I sólo fue detectada en la cisterna perinuclear (Peitsch et al., 1994). El patrón de distribución de la DNasa I y los resultados de su co-localización con organelos con membrana, indican que en las células BEL la enzima está contenida en el retículo endoplásmico, aparato de Golgi y vesículas. Esta localización no es inesperada teniendo en cuenta que el ARN mensajero presente en estas células posee los nucleótidos que codifican para el péptido señal. El tratamiento con Tritón X-100 es una forma de extraer, de forma gradual, componentes celulares en el eje ápico-basal de la célula, en particular en los intervalos de tiempo cortos. Estos experimentos confirmaron la ya descrita localización de la DNasa I en células BEL y

pusieron en evidencia la presencia de la enzima en la cisterna perinuclear, como ha sido descrita en fibroblastos en cultivo (Peitsch et al., 1994) y linfocitos (Peitsch et al., 1993).

En las células acinares del páncreas (Bendayan et al., 1980) y en células de Paneth del intestino delgado (Shimada et al., 1998a) la determinación de la localización de la enzima fue realizada mediante microscopía electrónica de transmisión. En estas células las estructuras que exhibían los niveles más altos de marcado con los anticuerpos eran los gránulos de secreción que se acumulaban hacia la región apical de las células. El retículo endoplásmico y el aparato de Golgi también se marcaban, pero en menor grado. En ningún caso se menciona la presencia de la enzima en la cisterna perinuclear, en donde sí encontramos la enzima en células BEL. Será necesario en el futuro analizar la distribución de la DNasa I en células BEL mediante microscopía electrónica de transmisión.

El análisis de las imágenes obtenidas por microscopía confocal indica que en células BEL la DNasa I está localizada en una subpoblación de vesículas, que se concentra en la región basal de las células. Estos resultados sugieren la existencia de una forma de tránsito dirigido de vesículas conteniendo DNasa I hacia la cara basal de las células. Esta sería la primera vez que se muestra la localización polarizada de vesículas conteniendo DNasa I en la región basal de las células. En el futuro, será importante determinar si en las células epiteliales del cristalino *in vivo* existe un tránsito vesicular dirigido asimismo hacia la cara basal de las células.

Liberación al medio extracelular

La localización subcelular de la DNasa I en células BEL sugería la posibilidad de que ésta fuera liberada al medio de cultivo. Obtuvimos dos tipos de evidencias que indican que la DNasa I es secretada por las células BEL. Mediante inmunoprecipitación con anticuerpos anti-DNasa I obtuvimos una banda de idéntica movilidad electroforética que la DNasa I cristalina. Por otro lado, ensayos de actividad nucleasa sobre ADN doble cadena de alto peso molecular pusieron de manifiesto que en el medio de cultivo condicionado por células BEL existía una actividad nucleasa capaz de generar un patrón de fragmentos de ADN similar al generado por la DNasa I pancreática. Los únicos datos disponibles respecto a la secreción de DNasa I *in vitro* fueron obtenidos en células COS-1 transfectadas con un plásmido conteniendo el ADNc de la enzima. De acuerdo a los resultados de Polzar y colaboradores (1994), la enzima presente en el medio de cultivo de estas células tiene menor peso molecular que la presente en los extractos citoplásmicos. Los autores postulan la posibilidad de que la proteína presente en los extractos sea una forma sin procesar, o que la enzima secretada sea clivada por proteasas presentes en el medio de cultivo (Polzar et al., 1993).

En nuestros experimentos mostramos que la DNasa I presente en el suero bovino tiene mayor tamaño que la enzima pancreática, al igual que sucede en el ratón (Napirei et al., 2000). Por lo tanto no podemos excluir la

posibilidad que estemos detectando también DNasa I que al quedar adsorbida a las células no haya podido ser eliminada en los lavados previos a la incorporación del medio de cultivo sin suero fetal bovino. Para confirmar la secreción de DNasa I al medio de cultivo, repetiremos los experimentos realizando previamente el marcado metabólico de proteínas o eliminando la DNasa I del suero fetal bovino usado en el medio de cultivo de las células.

Glicosilación de la DNasa I cristalínea

En todos los zimogramas y Western-blots la enzima presente en todos los tipos celulares del cristalino bovino, incluso la expresada en células BEL, siempre exhibió mayor tamaño que la DNasa I pancreática. Al comparar el perfil de migración de la DNasa I cristalínea y la de parótida observamos que no existía diferencia de movilidad electroforética entre ellas. Incluso estudiamos la DNasa I presente en el suero fetal bovino, la cual también presentó mayor peso molecular que la enzima pancreática. La diferencia de tamaño de la enzima pancreática y la de parótida bovinas se conoce desde hace muchos años y más recientemente, se han descrito diferencias similares entre la enzima pancreática y la presente en otros tejidos como bazo, pulmones y glándula adrenal. Estas diferencias de movilidad electroforética, del orden de 3 Kda, han sido asignadas a diferencias en el contenido de carbohidratos de las enzimas (Abe y Liao, 1983; Nishikawa y Mizuno, 2001).

En la secuencia de la DNasa I bovina existen dos sitios posibles de glicosilación ubicados en los Asn 18 y 106 de la proteína madura. La enzima pancreática posee una sola cadena de carbohidratos asociada al Asn18. La presencia de este carbohidrato enlentece la migración electroforética de la proteína. El número de cadenas carbohidrato asociadas varía en función del tipo celular en el que se exprese la proteína. Nishikawa y Mizuno (2001) realizaron experimentos de desglicosilación de la DNasa I presente en glándula submaxilar y riñón con la enzima PNGasa F. El análisis del perfil electroforético de alícuotas de las enzimas tratadas durante diferentes intervalos de tiempo, mostró la presencia de dos cadenas de carbohidratos en la enzima de la glándula submaxilar y una en la de riñón. Nuestros ensayos de desglicosilación de la DNasa I cristalínea con PNGasa F muestran que la misma está glicosilada, ya que el tratamiento con la glicosidasa provoca un cambio en la migración electroforética de la misma. Al comparar los perfiles electroforéticos de la DNasa I pancreática y cristalínea glicosiladas y desglicosiladas se puso en evidencia que la diferencia de tamaño observada entre ambas enzimas correspondía al contenido de carbohidratos. No podemos descartar la posibilidad de que la enzima cristalínea posea solo uno de los sitios de glicosilación ocupado y que la cadena de carbohidratos asociada sea más grande que en la enzima pancreática. Sin embargo teniendo en cuenta la similitud de tamaño entre la enzima cristalínea y la de parótida, creemos que la primera tiene, como la parótida, ambos sitios de glicosilación ocupados tanto *in vivo* como *in vitro*.

Es conocido que la eficiencia de glicosilación de los distintos sitios blanco es dependiente de los aminoácidos que ocupen la segunda y tercera posición de la secuencia señal (Shakin-Eshelman et al., 1996). El segundo sitio de glicosilación en la DNasa I está constituido por un ácido aspártico en la segunda posición y una serina en la tercera, lo que determinaría menor eficiencia de glicosilación en ese sitio. La capacidad de cada tejido de glicosilar o no, el segundo sitio podría ser un reflejo de diferencias en la glicosiltransferasa (Nishikawa y Mizuno, 2001) o en el contenido de precursores glucolipídicos (Carson et al., 1981) presentes en cada tipo celular. De confirmarse nuestra hipótesis, el cristalino sería uno de los tejidos en los que el segundo sitio de glicosilación de la DNasa I es utilizado, a pesar de poseer aminoácidos subóptimos en la segunda y tercera posición. Hasta el momento no se ha establecido una correlación entre el contenido glucosídico y la distribución de la enzima en los distintos tejidos. Es difícil pensar en una relación entre el contenido de carbohidratos y la fisiología de cada tipo celular, ya que DNasas I de páncreas de diferentes especies poseen una o dos cadenas asociadas. Las enzimas de bovino y ovino poseen una única cadena de carbohidratos asociada, mientras que la enzima porcina posee dos (Paudel y Liao, 1986). La enzima pancreática de *Xenopus* no tendría ninguna cadena de carbohidratos asociada, ya que el tratamiento de la enzima pura con la glicosidasa PNGasa F no provoca cambios en el perfil electroforético de la enzima (Takeshita et al., 2001).

DNasa I durante la apoptosis

Durante la apoptosis ocurren una serie de eventos que afectan al núcleo celular, entre ellos la fragmentación de la cromatina. La DNasa I es considerada una de las nucleasas apoptóticas, por lo tanto, teniendo en cuenta la presencia de la DNasa I en células BEL, consideramos la posibilidad de estudiar esta enzima durante el proceso apoptótico. Utilizamos la droga estaurosporina, ya que su capacidad inductora de apoptosis en estas células había sido demostrada anteriormente (Andersson et al., 2000). Al poder mantener un número relativamente alto de células apoptóticas adheridas al sustrato, pudimos estudiar distintas etapas del proceso.

En nuestras observaciones distinguimos núcleos con distintos grados de condensación de la cromatina. Algunos núcleos con numerosos y pequeños acúmulos de cromatina condensada, otros de grandes acúmulos y finalmente otros, en los que la cromatina condensada forma parte de cuerpos apoptóticos. La formación de acúmulos de cromatina condensada en núcleos apoptóticos es bien conocida y ha sido estudiada en detalle, inclusive en núcleos aislados (Lezbeznik et al., 1993; Collins et al., 1997). Los resultados obtenidos con la técnica TUNEL, muestran que los núcleos TUNEL positivos son aquellos que presentan los grandes acúmulos de cromatina condensada, mientras que solo algunos núcleos de las etapas previas lo son. Esto indica, entonces, que si bien la condensación de la

cromatina es uno de los primeros eventos nucleares durante la apoptosis, la acumulación de cortes 3'OH comienza un poco más tarde como lo describieran Lazebnik y colaboradores (1993). Es posible que el ADN presente en los pequeños acúmulos de cromatina condensada esté cortado pero en grandes fragmentos de 300-50 Kbs (Oberhammer et al., 1993). Es más, algunos análisis cinéticos realizados para determinar el grado de degradación del ADN en función del tiempo correlacionándolo con el tamaño y número de acúmulos de cromatina condensada, sugieren que la formación de los fragmentos oligonucleosómicos de ADN ocurre en aquellos núcleos en los cuales ya se han formado grandes acúmulos de cromatina condensada (Lazebnik et al., 1993).

En nuestros experimentos de inducción de apoptosis en células BEL, encontramos que una fracción de la DNasa I citoplásmica transloca al interior de núcleos en los que no habría comenzado la condensación de la cromatina. Un poco más adelante en el proceso apoptótico la enzima se localiza en acúmulos no muy grandes de cromatina condensada, pero solo en algunos núcleos. Finalmente, en los cuerpos apoptóticos la enzima co-localiza con todos los acúmulos de cromatina condensada. Nuestros resultados indican que durante el proceso apoptótico inducido por estausrosporina, la DNasa I podría tener un rol en las etapas tardías de la fragmentación del ADN, cuando ya se han formado los acúmulos de cromatina condensada y son los primeros en mostrar la co-localización de una nucleasa y acúmulos de cromatina condensada TUNEL positivos.

La DNasa I fue propuesta como nucleasa apoptótica originalmente por Tschopp y colaboradores (1993), al poner en evidencia que la nucleasa extraída de timocitos apoptóticos, inducidos por glucocorticoides, era la DNasa I y que sería la responsable de la generación de fragmentos oligonucleosómicos (Peitsch et al., 1993). Puccetti y colaboradores (2001) mostraron que una cepa de células JURKAT, con la región codificante del gen de la DNasa I deletada, no exhibe degradación del ADN en fragmentos oligonucleosómicos al ser tratadas con inductores apoptóticos como cicloheximida, taxol o el inhibidor de la topoisomerasa etopósido. Este efecto era revertido al re-introducir el ADNc de la DNasa I en las células (Oliveri et al., 2001). Estos autores sugieren que la DNasa I tiene un rol en la generación de fragmentos oligonucleosómicos en etapas tardías del proceso de degradación del ADN durante la apoptosis.

La translocación de la DNasa I al núcleo de células apoptóticas fue detectada en células del epitelio intestinal ubicadas en el extremos de las vellosidades (Polzar et al., 1994), en células de la epidermis (Zanotti et al., 1995) y en células de la próstata deprivadas de andrógenos (Rauch et al., 1997). En las células epiteliales de la próstata la DNasa I no está presente, pero 6 horas después de castrado el animal, ésta comienza a detectarse en el citoplasma. Concomitantemente con el aumento en la cantidad de la enzima en la célula, se observó un aumento en la cantidad de su ARN mensajero, el que llega a un máximo tres días después de haber comenzado la privación de andrógenos. En ese momento, los autores localizan la

enzima en el retículo endoplásmico, aparato de Golgi y en el interior de unos pocos núcleos, cuyo número aumenta 48 horas después. Hasta el momento éste es el único estudio en el que se muestra un aumento en los niveles de transcripción del ARN mensajero de DNasa I durante el proceso apoptótico. Sin embargo, Liu y colaboradores (1997), trabajando *in vitro* con líneas celulares tratadas con VM26, no detecta el aumento de estos transcritos. Tenemos pendiente realizar experimentos de PCR cuantitativo en células BEL tratadas con estaurosporina para determinar si en ellas ocurre un aumento en los niveles del transcripto para la DNasa I, ya sea por aumento en la transcripción o cambios en los eventos de “splicing” que modifiquen las cantidades relativas del transcripto completo y los de menor tamaño.

La localización de la DNasa I en el retículo endoplásmico y aparato de Golgi en células BEL, plantea el problema del mecanismo de translocación al núcleo. Nuestros resultados sugieren que la translocación ocurre después del inicio de la degradación de la lámina nuclear. Esto llevaría a que se perdiera la integridad de la envoltura nuclear, entonces, la DNasa I ubicada en la cisterna perinuclear podría tener acceso al ADN. En muchos tipos de células apoptóticas la degradación de las laminas es un evento temprano e importante de la fase de ejecución de la apoptosis (Neamati et al., 1995; Weaver et al., 1996). La expresión de laminas mutantes, no degradables por caspasas, provoca una demora significativa en los eventos de compactación y degradación de la cromatina, sugiriendo una relación entre la degradación de la lámina nuclear y la llegada de la o las nucleasas apoptóticas al interior del núcleo (Rao et al., 1996). Kihlmark y colaboradores (2001) mostraron que la degradación de algunos componentes de la envoltura nuclear, durante la apoptosis de células BRL tratadas con estaurosporina, ocurre de manera ordenada. La proteína POM121, proteína integral de membrana que forma parte del complejo de poro, es la primera en degradarse y luego las laminas. Esta degradación es dependiente de caspasas, ya que el pretratamiento con un inhibidor general de esas proteasas inhibe la degradación de la envoltura nuclear. Es interesante señalar que el tratamiento simultáneo con estaurosporina y el inhibidor de caspasas, impide la formación de los grandes acúmulos de cromatina condensada TUNEL positivos. Estos resultados sugieren que en estos núcleos, el ADN no está cortado en fragmentos oligonucleosómicos (Kihlmark et al., 2001). Podríamos especular que una posible causa para estos resultados, es que la o las nucleasas responsables de ese tipo de fragmentación no hayan tenido acceso al interior del núcleo. Pensamos realizar ensayos similares en células BEL para determinar el destino de la DNasa I en esas condiciones experimentales. Por otra parte no debemos olvidar que la fragmentación del ADN ocurre en etapas y que diferentes nucleasas pueden estar involucradas en cada una de ellas e inclusive que las enzimas varíen dependiendo del tipo celular y del agente inductor de la apoptosis. Por lo que será interesante repetir los experimentos en células BEL pero con otro tipo de agente inductor.

Existen similitudes en algunos aspectos de la desintegración nuclear que tienen lugar durante la diferenciación de las fibras del cristalino y la apoptosis. Éstas han llevado a postular la hipótesis de que la diferenciación de las fibras del cristalino representa una forma atenuada de apoptosis, en la que no se llega a eliminar la célula por completo (Dahm, 1999). En ambos procesos las caspasas son activadas (Ishizaki et al., 1998; Earnshaw et al., 1999), las laminas degradadas (Dahm et al., 1998; Rao et al., 1996) y los complejos de poro agrupados en sectores discretos de la envoltura nuclear (Dahm y Prescott, 2002; Reipert et al., 1996). En ambos procesos también la cromatina se condensa y degrada hasta generar fragmentos oligonucleosómicos (Appleby y Modak, 1977; Bassnett y Mataic, 1997; Wride y Sanders, 1998; Robertson et al., 2000). Nuestros resultados muestran que en ambos procesos la DNasa I transloca al interior de núcleos en los que ya está desencadenada su desintegración.

Conclusiones y perspectivas para el futuro.

El conjunto de resultados presentados en esta Tesis han permitido avanzar en el conocimiento de la estructura del gen de la DNasa I en bovinos. Demostramos la presencia de la DNasa I en el cristalino, tanto a nivel de ARN mensajero como de proteína, así como la existencia de cambios en su localización subcelular durante el proceso de diferenciación de las fibras, los que culminan con el ingreso de la enzima a los núcleos de fibras profundas. Mostramos que en células BEL, la DNasa I está localizada en los organelos de la vía de secreción de proteínas y que sería secretada al medio de cultivo. Finalmente, mostramos la translocación de la DNasa I al núcleo de células apoptóticas y su co-localización con sectores de ADN condensado con cortes 3'OH libres en las etapas finales de la apoptosis.

En lo inmediato, planeamos culminar la secuenciación del gen de la DNasa I incluyendo la región 5' no codificante. Esto nos permitirá determinar la presencia de elementos de regulación de la expresión, y en el futuro realizar experimentos que permitan analizar posibles factores inductores o represores de la expresión de este gen. Comenzaremos analizando si las células BEL son competentes para responder a somatostatina, hasta ahora el único factor capaz de afectar la transcripción de DNasa I. Planeamos secuenciar los otros fragmentos de amplificación obtenidos, con el fin de determinar si los mismos son productos resultantes de "splicing" alternativo. Sería interesante encontrar algún transcripto en el que haya sido eliminado el exón 2, ya que esto llevaría a que en caso de ser traducido, la proteína se localizará en el citosol, donde podría tener un rol como cristalina o reguladora del esqueleto de actina. Ampliaremos el análisis de la distribución de DNasa I, laminas y organelos con membrana en cortes sagitales de cristalino mediante microscopía confocal. Esperamos así determinar el orden en el que ocurre la degradación del retículo endoplásmico, aparato de Golgi y la envoltura nuclear, el momento de ingreso de la DNasa I al núcleo y su co-localización con sectores de ADN fragmentado.

A mediano plazo, planeamos repetir los experimentos de inducción de apoptosis transfectando células BEL con oligonucleótidos anti-sentido para el ARN mensajero de la DNasa I. Esto nos permitirá determinar si la transcripción *de novo* de la DNasa I es necesaria o si se utiliza la enzima presente en la célula en ese momento. Planeamos determinar los efectos de inhibidores de las caspasas, en particular de las caspasas 3 y 6 cuyos blancos son las laminas, sobre la evolución temporal de la translocación de la DNasa I al núcleo y sus efectos sobre la fragmentación del ADN.

A más largo plazo abordaremos el estudio del rol de la DNasa I en células del cristalino embrionario de roedores. *In vitro* las células epiteliales del cristalino de estos animales pueden diferenciarse en fibras. Trabajando en este modelo experimental podremos estudiar el proceso de denucleación y determinar si los cambios observados en la distribución de la DNasa I *in vitro* son similares a los *in vivo*. Este modelo nos permitirá además determinar si la DNasa I es una de las enzimas involucradas en la fragmentación del ADN, que tiene lugar durante la diferenciación de las fibras del cristalino. También podremos analizar el rol de factores como el TNF y el FGF como factores desencadenantes de los procesos de degradación de organelos durante la diferenciación de las fibras.

Finalmente consideramos fundamental poder analizar los cristalinos de ratones transgénicos en los que uno o ambos alelos de la DNasa I hayan sido eliminados. De esta forma podremos establecer el papel de la DNasa I en la degradación nuclear de las fibras del cristalino y durante el proceso apoptótico de células epiteliales *in vitro*. El conocimiento de todos los actores involucrados en la degradación de los organelos internos de las fibras cristalíneas, permitirá avanzar en la comprensión de procesos de diferenciación terminal normal, así como de situaciones patológicas en las que dicho proceso no ocurre, como las cataratas congénitas y hereditarias.

IV. MATERIALES Y METODOS

Animales

Se emplearon ojos de bovinos cuyas edades estaban comprendidas entre tres y cuatro años, obtenidos en el Frigorífico, Matadero Carrasco. La disección de los ojos y cristalinos fue realizada en nuestro laboratorio entre 1 y 3 horas después de sacrificados los animales.

Disección del ojo

La disección se inició realizando un corte circunferencial en el globo ocular, 5 mm por fuera del límite externo de la cornea. La misma fue extraída dejando expuesto el iris sobre el cristalino. El iris fue eliminado, cortando los filamentos ciliares, con cuidado de no perforar la cápsula cristalínea. El cristalino fue separado del humor vítreo y procesado de inmediato.

Separación de las distintas regiones del cristalino

El epitelio fue aislado de la masa de fibras realizando un corte circunferencial a nivel del ecuador del cristalino. Con una pinza de punta fina fue separada la cápsula, a la que sale adherido el epitelio. Las distintas regiones de fibras corticales fueron obtenidas separando regiones concéntricas de fibras (respecto al eje óptico del cristalino) cada vez más profundas, hasta llegar a la región de fibras nucleares identificable por su consistencia más compacta.

Cultivos celulares

Una vez aislados, los epitelios del cristalino fueron mantenidos en solución amortiguadora isotónica de bicarbonato de sodio sin calcio ni magnesio, conteniendo 0.25% de tripsina, 10 mM EDTA y 1 g/l de glucosa. Luego de 15 minutos de incubación a 37° C, la suspensión celular fue pipeteada varias veces hasta disociar completamente las células. La siembra fue realizada en cajas de Petri de plástico (Falcon) con o sin laminillas de vidrio. Las células fueron cultivadas en medio mínimo esencial modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino. Los cultivos fueron mantenidos a 37° C en atmósfera húmeda conteniendo 5% de CO₂.

Repiques celulares

Los repiques se realizaron a partir de cultivos en confluencia. Una vez eliminado el medio de cultivo, las células fueron lavadas con PBS seguido de un lavado rápido con la solución tampón conteniendo tripsina. Luego, incubadas entre 6 y 8 minutos a temperatura ambiente con la solución de tripsina, controlando al microscopio el momento en que la mayoría de las células se redondeaban. Luego de pipetear suavemente varias veces para separar las células del sustrato, se agregó medio de cultivo suplementado con suero para detener la reacción enzimática. La

suspensión de células fue repartida manteniendo relaciones de división 1:2 a 1:8.

Experimentos de inducción de apoptosis

Las células fueron repicadas y sembradas a baja densidad sobre laminillas de vidrio en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino. Luego de 48 horas en cultivo, el medio fue cambiado por medio fresco sin suero conteniendo estaurosporina en una concentración final de 1-2 μ M. En todos los experimentos las células control fueron mantenidas en medio de cultivo sin suero con DMSO (1 μ l/ml). Para determinar el tiempo de tratamiento con la droga se esperó hasta que más del 50% de las células estuviera en la fase de retracción citoplásmica, lo cual generalmente ocurría entre las 6 y 8 horas de incubación. En todos los casos los cultivos fueron mantenidos a 37° C en atmósfera húmeda conteniendo 5% de CO₂.

Anticuerpos

Para la inmunodetección de la DNasa I se utilizaron anticuerpos policlonales de conejo producido por la empresa Rockland (USA) (AbpR) y sueros de conejo anti-DNasa I preparados por nosotros. Para inmunolocalizar laminas, se utilizó el anticuerpo monoclonal L3f4 que reconoce todas las clases de laminas de mamíferos (Alsheimer y Benavente, 1996) cedido por el Dr. Ricardo Benavente. Los anticuerpos anti-IgG de conejo conjugados con peroxidasa y fluoresceína y los anti-IgG de ratón conjugados con fluoresceína procedieron de Gibco Invitrogen (USA) y los conjugados a Alexa fluor 488 y 546 de Molecular Probes (USA). Los anticuerpos anti-IgG de ratón conjugados con rodamina fueron de SIGMA (USA).

Generación de los sueros anti-DNasa I pancreática bovina

Los conejos fueron mantenidos en el bioterio de la Cátedra de Inmunología de la Facultad de Química. La preparación de sueros específicos para DNasa I se realizó inmunizando cuatro conejos con la enzima pancreática bovina. En dos de ellos se usó como inmunógeno la enzima comercial sin procesar y en los otros dos la banda mayoritaria visible por SDS-PAGE de la misma preparación; en todos los casos el antígeno fue administrado con adyuvante de Freund incompleto. Una vez obtenida una muestra de suero preinmune, la primer inmunización (1 mg de DNasa I por animal) fue realizada mediante varias inyecciones subcutáneas en la región dorsal del conejo. El protocolo de inmunizaciones y sangrado que utilizamos, a partir de un mes de realizada la primer inmunización, fue el siguiente: inyección intramuscular del antígeno (300-500 μ g de DNasa I) y 15 días después el sangrado. Se obtuvieron sueros a partir de los cuatro conejos, que reconocían a la enzima en dot-blots y Western-blots, aunque con títulos diferentes.

Para aumentar la especificidad, inmunopurificamos los anticuerpos mediante cromatografía de afinidad con columnas de DNasa I comercial (Sigma) acoplada a Sepharosa 4B activada.

RT-PCR y secuenciación

Extracción de ARN

El ARN total de epitelios de cristalino y de cultivos multicapa de células BEL fue purificado con el reactivo Trizol (Gibco Invitrogen), que contiene isotiocianato de guanidina y fenol. Se utilizó 1 ml de este reactivo por cada 15 epitelios y 3 ml por cada cultivo multicapa de cajas de Petri de 60 mm de diámetro. Luego de homogeneizar, la muestra fue incubada 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregó 1/5 de volumen de cloroformo y se agitó por inversión durante 15 segundos. Luego de 3 minutos de incubación a temperatura ambiente, las muestras fueron centrifugadas a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se pasó la fase acuosa a otro tubo, se agregó 1 volumen de alcohol isopropílico y se incubó la muestra a temperatura ambiente durante 10 minutos. Al final de una centrifugación de 10 minutos a 13000 rpm a 4°C, el ARN formó un precipitado blanquecino en el fondo del tubo que fue lavado con alcohol 75°. Finalmente se eliminó el sobrenadante del último lavado y se dejó secar al aire durante 10 minutos. El ARN precipitado fue solubilizado en agua ultrapura conteniendo 1 U/μl de inhibidor de RNasas (Gibco Invitrogen). La concentración y pureza del ARN fueron determinadas por absorbancia (Abs 260nm/ Abs 280nm); aquellas muestras cuyos valores fueron inferiores a 1.7 o mayores a 1.9 fueron descartadas. En algunas ocasiones los ARN mensajeros fueron purificados mediante columnas de oligonucleótidos poli-dT unidos a perlas de celulosa de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Biolabs).

Síntesis del cDNA

Para la síntesis del ADN copia se utilizó la transcriptasa reversa del virus de Leucemia Murina de Moloney (M-MLV RT) y un oligonucleótido cebador poli-dT(15) (Promega) en un volumen de reacción de 20 μl, partiendo de 1 μg de ARN total o 50 ng de ARN mensajero. La mezcla de reacción fue incubada a 42 °C durante 30 minutos, luego de los cuales la reacción fue detenida por incubación a 95 °C durante 5 minutos, seguido por una incubación en hielo de 5 minutos. El ADN copia resultante fue alícuotado y guardado a -20 °C hasta su utilización.

Oligonucleótidos

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación por PCR fueron seleccionadas a partir de la secuencia del ARN mensajero de la DNasa I pancreática bovina (Genbank AJ001538). Todos los oligonucleótidos fueron sintetizados por la empresa OPERON (USA).

Oligonucleótido A1	5'	121	ATG	AGG	GGC	ACC	AGG	CTG	AT	140	3'
Oligonucleótido A2	5'	378	CTA	TGT	GGT	CAG	TGA	GCC	GC	397	3'
Oligonucleótido A	5'	421	CTG	AAC	AGA	AAG	AGG	TAG	CG	440	3'
Oligonucleótido Z2	5'	438	GGA	CAC	CTT	GTT	GGG	TCT	G	456	3'
Oligonucleótido B	5'	752	GTC	AGG	AAT	CAG	CCA	CTG	G	780	3'
Oligonucleótido Z1	5'	1001	GTT	GTC	TTC	AGC	TCC	CAG	CG	1020	3'

Oligonucleótidos para aldolasa

Oligonucleótido ALD2	5'	CCCATCAGGGAGAATTTTCAGGCTCCACAA	3'
Oligonucleótido ALD11	5'	GTGATCCTCTTCCACGAGACACT	3'

Los oligonucleótidos para aldolasa fueron diseñados por M^a Noel Cortinas a partir de la secuencia del ARN mensajero de la aldolasa A de ratón (Genbank Y00516).

Reacción en cadena de la polimerasa: PCR

En todas las amplificaciones se utilizó la enzima Taq Platinum (Gibco Invitrogen). En las amplificaciones a partir de ADNc se usaron los oligonucleótidos A1 y Z1, los que permiten amplificar toda la secuencia codificante. Para amplificar la secuencia genómica se utilizó ADN bovino de timo de origen comercial (Boheringer Mannheim) y las siguientes parejas de oligonucleótidos: A1/A y A2/Z2. El protocolo de ciclado fue el que se detalla a continuación: 5 minutos a 94°C, seguidos por 35 ciclos de tres etapas (desnaturalización, empalme y extensión) de 45 segundos cada una, a 94° C, 57° C y 72° C respectivamente, finalizando con una incubación de 7 minutos a 72° C.

Electroforesis de ácidos nucleicos

Geles de agarosa

Para determinar una posible degradación del ARN purificado, éste fue analizado por electroforesis en geles de agarosa (1.2%). Para ello se mezclaron muestras de 1 µg de ARN con solución de carga 6X (0.25% de azul de bromofenol, 30% de glicerol, 1.2% de SDS en solución tampón de fosfato de sodio 60 mM pH 6.8). Los geles, conteniendo 1µg/ml de bromuro de etidio fueron preparados y corridos en solución tampón TBE de acuerdo al protocolo propuesto por Kevil y colaboradores (1997) que no utiliza formaldehído. Los geles fueron observados con luz ultravioleta.

Para purificar los distintos productos de amplificación, usamos electroforesis en geles de agarosa de bajo punto de fusión (2%). Los geles fueron preparados y corridos en solución tampón TBE, coloreados con bromuro de etidio (1µg/ml) y observados en con luz ultravioleta. Las bandas fueron cortadas y el ADN extraído en columnas de resina del Kit Concert rapid gel extraction system (Gibco Invitrogen). El ADN eluido en solución tampón TE fue precipitado con 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M y 2 volúmenes de alcohol absoluto, dejándolo toda la noche a -20°C. Luego de una centrifugación de 15 minutos a 13.000 rpm y de varios

lavados en alcohol 70°, el precipitado de ADN fue disuelto en agua ultrapura.

Geles de poliacrilamida

Para verificar los resultados de las amplificaciones algunas alícuotas de cada una de ellas fueron analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida 6% en solución tampón TBE. En todos los geles se incorporó una muestra de marcadores de tamaño molecular. Estos geles fueron coloreados con nitrato de plata de acuerdo al protocolo propuesto por Sanguinetti y colaboradores (Sanguinetti et al., 1994).

Secuenciación

La secuenciación fue realizada por el Servicio CTAG de la Facultad de Ciencias, utilizando el kit de secuenciación por ciclado Big Dye Terminator (Perkin Elmer Biosystems) de acuerdo a las condiciones del fabricante. Se usó un equipo de secuenciación automática ABI Biosystems 310. Los oligonucleótidos utilizados en la secuenciación fueron A1, A2, A, B y Z1.

Determinación de actividades nucleasa

En geles de poliacrilamida

La solubilización de las células fue realizada en solución tampón Tris-HCl 10 mM, pH 7.2 conteniendo 1-2% de SDS y 1 mM de CaCl₂. Las muestras fueron hervidas 1 minuto antes de usarlas. Las proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida 12%T/0.9%C o 15%T/2.6%C conteniendo 0.1% de SDS (SDS-PAGE) y 30 µg/ml de ADN de doble cadena de alto peso molecular (Pharmacia-LKB) de acuerdo a la técnica de Rosental y Lacks (1977). Una vez finalizada la corrida electroforética, los geles fueron lavados exhaustivamente e incubados, en solución tampón Tris-HCl 10 mM pH 7.4 conteniendo 10 mM de CaCl₂ y MgCl₂, a 37° C durante 16 horas. La coloración fue realizada con Azul de Toluidina al 2% en solución acuosa. Las actividades nucleasa se vieron como bandas claras sobre el fondo azul.

En geles de agarosa

Para determinar la presencia de actividades nucleasa en el medio de cultivo condicionado, las muestras problema fueron incubadas con ADN doble cadena de alto peso molecular durante 24 horas. Luego el ADN fue precipitado con 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M y 2 volúmenes de alcohol absoluto durante toda la noche a -20 °C. Luego de una centrifugación de 15 minutos a 13.000 rpm, el ADN formó un precipitado visible que fue lavado varias veces en alcohol 70°. El ADN precipitado fue disuelto en solución TE pH 8. El ADN fue resuelto por electroforesis en geles de agarosa 0.8% a voltaje constante (50 V) durante 1 hora 30 minutos. Finalmente los geles fueron coloreados con bromuro de etidio y observados con luz ultravioleta.

Electroforesis de proteínas

Cuantificación de proteínas

Para determinar la concentración de proteínas en las muestras para electroforesis, se utilizó el método del ácido bicinónico (BCA). Este método permite analizar muestras solubilizadas con 1 % de SDS (Walker, 1994).

SDS-PAGE

Las electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS, fueron llevadas a cabo de acuerdo al procedimiento descrito por Laemmli (1970), usando 12%T/0.9%C de acrilamida para el gel de separación y 5%T/2.6%C para el de concentración. La electroforesis fue realizada a voltaje constante, 80 V en el gel de concentración y 130 V en el gel de separación. Los geles fueron coloreados con Azul Brillante de Coomassie 250R o preparados para ser electrotransferidos a nitrocelulosa.

Electrotransferencia.

Los geles PAGE fueron electrotransferidos a nitrocelulosa de acuerdo al método de Towbin y colaboradores (1979) durante 16 horas a 100 mA a 8°C. Una vez finalizada la electrotransferencia, la nitrocelulosa era coloreada con rojo Ponceau S y guardada a -20°C hasta el momento de usarse.

Inmunodetecciones

En membranas de nitrocelulosa

Una vez eliminado el rojo Ponceau S, las membranas de nitrocelulosa fueron bloqueadas con leche al 6% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó la incubación con el anticuerpo anti-DNasa I, AbpR (en una dilución de 40 µg/ml en leche al 1% en PBS) o el suero 2983 purificado por afinidad (sin diluir). Como segundo anticuerpo se utilizaron anticuerpos de cabra anti-IgGs de conejo, conjugadas con peroxidasa (dilución 1:1500 en leche al 1% en PBS). Todas las incubaciones y lavados fueron realizados en agitación continua. Los revelados fueron realizados mediante quimioluminiscencia usando ECL (Amersham) o Super Signal Pico Plus (Pierce) y placas radiográficas (Konica).

En células y cortes histológicos

Las células fueron fijadas en paraformaldehído (PAF) al 3.7% en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente. Una vez eliminado el fijador, fueron bloqueadas con seroalbumina bovina (BSA) al 3% en PBS 30 minutos a temperatura ambiente. Se incubó con el anticuerpo anti-DNasa I (AbpR dilución 10 µg/30 µl de BSA al 1% en PBS, suero 2983 purificado por afinidad diluido a la mitad en BSA al 1%) durante 1 hora a 37° C en atmósfera húmeda. Luego de realizar varios lavados, se incubó con un anticuerpo de cabra anti-inmunoglobulinas de conejo, conjugado con fluoresceína, rodamina o Alexa. Los montajes fueron realizados en glicerol:PBS (9:1).

En el caso de los epitelios, una vez separados de las fibras cristalineanas, fueron fijados en PAF al 3.7% en PBS durante 2 horas. Luego de eliminar el fijador, fueron sumergidos en solución de sacarosa al 20% en PBS toda la noche a 4°C para crioprotección. Los bloques fueron armados en OCT y congelados en nitrógeno líquido. En el caso de los cristalinos enteros, los mismos fueron congelados directamente en nitrógeno líquido. Se realizaron cortes de 10-20 µm de grueso en un criostato CRIOCUT E (Reichert-Jung) a -20° C que fueron montados en portaobjetos cubiertos con gelatina-alumbre de cromo. El protocolo de inmunodetección realizado fue el mismo que para las células. El montaje fue realizado en glicerol:PBS (9:1). Para determinar la organización celular y la morfología nuclear algunos cortes fueron coloreados con hematoxilina y eosina.

En el caso del marcado para laminas, las células y los cortes fueron fijados en metanol durante 10 minutos a -20° C seguido de acetona durante 1 minuto a -20° C. El anticuerpo primario L3f4 (sobrenadante del hibridoma sin diluir) fue incubado 1 hora a temperatura ambiente. Como segundo anticuerpo fueron usados anticuerpos anti-inmunoglobulinas de ratón conjugados con fluoresceína, rodamina o Alexa.

En todos los casos el marcado nuclear fue realizado incubando las células con Hoechst 33342 al 0.0005% (Molecular Probes) durante 5 minutos. Los preparados fueron fotografiados en un microscopio Microphot FX-A equipado con epifluorescencia (Nikon) utilizando película ILFORD HP5 PLUS.

Microscopía confocal

En algunos casos los preparados fueron observados con un microscopio confocal Nikon Eclipse 800 equipado con el sistema laser: Laser Scanning System Radiance 2000 (BioRad) de la Universidad Austral, Pilar, Argentina. En estos casos, el marcado nuclear fue realizado con yoduro de propidio (1 µg/ml). Para la visualización de los fluoróforos se utilizaron las líneas 488 (laser argón con el filtro de emisión HQ515/30) y 543 (laser helio-neón con el filtro de emisión HQ590/70). Las imágenes confocales fueron procesadas utilizando el programa Confocal Assistant 4.02 (BIORAD).

Procesamiento de las imágenes

Todas las imágenes fueron tratadas y coloreadas mediante el programa Adobe Photoshop 5.0 con el que además se realizaron los montajes para determinar la co-localización de los diferentes componentes celulares.

Marcado de organelos celulares

Mitocondrias

Para determinar la localización de las mitocondrias en las células se utilizó la sonda fluorescente rodamina 123 (10 µg/ml). Para ello las células sin fijar fueron incubadas con la sonda durante 15 minutos a 37°C. Luego de

un lavado muy rápido, fueron montadas en PBS y las fotografiadas dentro de los siguientes 30 minutos.

Organelos con membrana

Para determinar la distribución de los organelos con membrana se utilizó la sonda lipofílica fluorescente DiOC6 procedente de Molecular Probes (USA). Células sin fijar fueron incubadas con la sonda (0.5 µg/ml) durante 15 minutos a 37°C. Luego de un lavado muy rápido las células fueron montadas en PBS y fotografiadas en los siguientes 30 minutos. En otras ocasiones esta sonda (1µg/ml) fue usada en células y cortes fijados en PAF (4%). En estos casos la incubación fue de 10 minutos realizada al final de los experimentos, en caso de haberse realizado previamente una inmunodetección.

Experimentos de extracción con Tritón X-100

Extracción postfijación

El medio de cultivo de las células fue eliminado y se realizaron varios lavados rápidos en PBS. Las células fueron fijadas 10 minutos con PAF 4%. Luego de lavar varias veces en PBS para eliminar el fijador, fueron incubadas en Tritón X100 0.1% durante distintos tiempos. Una vez realizados los lavados para eliminar el detergente, se continuó con el protocolo normal de inmunodetección.

Extracción prefijación

El medio de cultivo fue eliminado y se realizaron dos lavados rápidos en PBS. Las extracciones con Tritón 0.5% fueron realizadas en baño de hielo durante distintos intervalos de tiempo. Luego de dos lavados muy rápidos en PBS para eliminar el detergente, las células fueron fijadas en PAF 4% durante 15 minutos. Posteriormente se continuó con el protocolo habitual de inmunodetección, obviando la permeabilización.

Inmunoprecipitación de DNasa I a partir de medio condicionado por células BEL

Los cultivos fueron repicados e incubados 48 horas en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino. Transcurrido ese intervalo de tiempo, se eliminó el medio con suero, las células fueron lavadas exhaustivamente y se administró DMEM sin suero. Cada caja de cultivo de 100 mm fue incubada con 10 ml de medio sin suero durante otras 24 horas. El medio condicionado fue colectado una vez verificado que no habían restos celulares en el mismo. Se partió de 50 ml de medio que fueron dializados durante 16 horas (a 4°C) contra 3 litros de agua ultrapura, realizando varios cambios durante ese tiempo. Posteriormente fueron liofilizados parcialmente de forma de disminuir su volumen 5 veces. A los aproximadamente 10 ml resultantes, les fue agregado 80 µg de anticuerpo AbpR y se incubó 16 horas a 4°C en rotación continua. Una vez finalizada la incubación se agregaron 10 µl de una suspensión de proteína A acoplada a perlas de agarosa (100 µg de proteína A totales) y se incubó en las mismas

condiciones otras 2 horas. Los complejos fueron purificados por centrifugación (15 segundos a 13.000 rpm) y lavados en PBS de la misma manera varias veces. Finalmente fueron solubilizados en solución de lisis conteniendo SDS (2%) y β -mercaptoetanol (5%) y analizados por Westernblot.

Experimentos de desglicosilación

Los experimentos de desglicosilación fueron realizados con DNasa I pancreática bovina de origen comercial y con DNasa I purificada por inmunoprecipitación a partir de medio condicionado por células BEL. Los complejos inmunes y la DNasa I pancreática fueron solubilizados en solución de lisis conteniendo SDS (0.5%) y β -mercaptoetanol (1%) e incubados 10 minutos a 100°C, de acuerdo a las condiciones requeridas por la enzima N-glicosidasa F (PNGasa F) usada para eliminar los glúcidos. Luego se agregó 1/10 de volumen de NP40 (10%) y de solución tampón de fosfato de sodio 60 mM pH 7.5. En este punto ambas muestras fueron divididas en dos tubos y se agregaron 250 U de enzima a un tubo de cada muestra. Todas las muestras fueron incubadas durante 1 hora a 37°C, transcurrida la cual fueron preparadas para electroforesis SDS-PAGE.

Detección de cortes 3'OH libres en el ADN "in situ", técnica TUNEL.

Se realizó la técnica descrita por Gavrieli y colegas obviando el tratamiento con proteinasa K (Gavrieli et al., 1992). En resumen, las células fueron fijadas en PAF 4% durante 40 minutos, permeabilizadas con Tritón 0.1% durante 5 minutos y bloqueadas con BSA durante 30 minutos. Luego de varios lavados rápidos en agua ultrapura, fueron incubadas 1 hora a 37°C con la mezcla de reacción para la enzima nucleotidil transferasa termial (TdT) la que contenía además de la enzima, dUTP biotinilado y CoCl₂ como cofactor (Boheringer). Luego de varios lavados en PBS las células fueron incubadas con extreptavidina conjugada a rodamina durante 1 hora a 37°C, los núcleos fueron coloreados con Hoechst 33342. Finalmente fueron montadas en glicerol:PBS (9:1).

V. BIBLIOGRAFIA

- Abe A y Liao T (1983). The immunological and structural comparisons of deoxyribonucleases I J. Biol. Chem. 258: 10283-10288.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K y Walker P (2002). Molecular biology of the cell. Capítulo 4. Editorial Garland Science.
- Alsheimer M, Fecher E y Benavente R (1998). Nuclear envelope remodelling during rat spermiogenesis: distribution and expression pattern of LAP2/thymopoietins. J. Cell Sci. 111:2227-2234.
- Andersson M, Sjostrand J, Petersen A, Honarvar A y Karlsson J (2001). Caspase and proteosome activity during staurosporin-induced apoptosis in lens epithelial cells. IOVS 41:2623-2632.
- Appleby D y Modak S (1977). DNA degradation in terminally differentiating lens fiber cell from chick embryos. PNAS 74:5579-5583.
- Arruti C, Chaudun E, De María A, Courtois Y y Counis MF (1995). Characterization of eye-lens DNases: long term persistence of activity in post apoptotic lens fibre cells. Cell Death Differen. 2:47-56.
- Aubert J, Bisserte G y Loucheux-Lefebvre M (1976). Carbohydrate-peptide linkage in glycoproteins. Arch. Biochem. Biophys. 175:410-418.
- Ball W (1971) Development of the rat salivary glands I. Accumulation of parotid gland DNase activity. J. Exp. Zool. 178:331-342.
- Bantsev V, Herbert K, Trecithick J y Sivak J (1999). Mitochondria of rat lenses: distribution near and at the sutures. Curr. Eye Res. 19:506-516.
- Baron W, Pan C, Spencer S, Ryan A, Lazarous S y Baker K (1998). Cloning and characterization of an actin-resistant DNase I-like endonuclease secreted by macrophages. Gene 215:291-301.
- Barr P y Tomei L (1994). Apoptosis and its role in human disease. Biotech. 12:487-493.
- Barry M y Eastman A (1992). Endonuclease activation during apoptosis: the role of cytosolic Ca²⁺ and pH. Biochem. Biophys. Res. Commun. 186:782-789.
- Basnakian A, Singh A y Shah S (2002). Identification and expression of deoxyribonuclease (DNase) I alternative transcripts in the rat. Gene. 2002 May 1;289(1-2):87-96.
- Bassnett S (1992). Mitochondrial dynamics in differentiating fiber cells of the mammalian lens. Curr. Eye Res. 11:1227-1232.
- Bassnett S (1995). The fate of the Golgi apparatus and the endoplasmic reticulum during lens fiber cell differentiation. IOVS 36:1793-1803.
- Bassnett S (1997). Fiber cell denucleation in the primate lens. IOVS 38:1678-1687.
- Bassnett S (2002). Lens organelle degradation. Exp. Eye Res. 74:1-6.
- Bassnett S y Beebe D (1992). Coincident loss of mitochondria and nuclei during lens fiber cell differentiation. Dev. Dyn. 194(2):85-93.
- Bassnett S, Croghan P, Duncan G (1987). Diffusion of lactate and its role in determining intracellular pH in the lens of the eye. Exp. Eye Res. 44:143-147.

- Bassnet S y Mataic D (1997). Chromatin degradation in differentiating fiber cells of the eye lens. *J. Cell Biol.* 137(1):37-49.
- Bause E y Legler G (1981). The role of the hydroxy amino acid in the triplet sequence Asn-Xaa-Thr(Ser) for the N-glycosylation step during glycoprotein biosynthesis. *Biochem. J.* 195:639-644.
- Baxter G, Smith P y Lavin M (1989). Molecular changes associated with induction of cell death in a human T-cell leukaemia line: putative nucleases identified as histones. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162:30-37.
- Beeley J (1977). Peptide chain conformation and the glycosylation of glycoproteins. *BBRC* 76:1051-1055.
- Bernardi G y Sandron C (1964). Studies on acid deoxyribonuclease I. Kinetics of the initial degradation of deoxyribonucleic acid by acid deoxyribonuclease. *Biochemistry* 3:1411-1418.
- Bernardi A, Gaillard C y Bernardi G (1975). The specificity of five DNases as studied by the analysis of 5' terminal doublets. *Eur J Biochem* 52:451-457.
- Bendayan M, Roth J, Perrelet A, y Orci L (1980). Quantitative immunocytochemical localization of pancreatic secretory proteins in subcellular compartments of the rat acinar cell. *J. Histochem. Cytochem.* 28:149-160.
- Berger y May (1964). *Comptes Rendous de la Académie de Sciences, Paris.* 259:1915.
- Billing L y Bonner J (1972). The structure of chromatin as revealed by deoxyribonuclease digestion studies. *BBA* 281:453-462.
- Blake C (1983). Exons – present from the beginning? *Nature* 306:535-537.
- Bradley R, Ireland M y Maisel H (1979). The cytoskeleton of chick lens cells. *Exp. Cell Res.* 28:441-453.
- Brancolini C, Benedetti M y Schneider C (1995). Microfilament reorganization during apoptosis: the role of Gas2, a possible substrate for ICE-like proteases. *EMBO J.* 14:5179-5190.
- Briggs M, Kadonaga A, Bell S y Than R (1986). Purification and biochemical characterization of the promoter-specific transcription factor, Sp1. *Science* 234:47-52.
- Cacia J, Quan C, Pai R y Frenz J (1998). Human DNase I contains mannose 6-phosphate and binds the cation independent mannose 6-phosphate receptor. *Biochem.* 37:15154-15164.
- Campbell V y Jackson D (1980). The effect of divalent cations on the mode of action of DNase I. The initial reaction products produced from covalently closed circular DNA. *J. Biol. Chem.* 255(8):3726-3735.
- Capetanaki Y, Smith S y Heath JP (1989). Overexpression of vimentin gene in transgenic mice inhibits normal lens cell differentiation. *J Cell Biol.* 109:1653-1664.
- Carson D, Earles B y Lennarz W (1981). Enhancement of protein glycosylation in slices by dolichylphosphate. *J. Biol. Chem.* 256:11552-11567.

- Carson D y Ribeiro J (1993). Apoptosis and the disease. *Lancet* 341:1251-1254.
- Casciola-Rosen L, Nicholson D, Chong T, Thornberry N, Miller D y Rosen A. (1996). Apopain/CPP32 cleaves proteins that are essential for cellular repair: a fundamental principle of apoptotic death. *J. Exp. Med.* 183:1957-1964.
- Catchpoole D y Stewart B (1995). Formation of apoptotic bodies is associated with internucleosomal DNA fragmentation during drug-induced apoptosis. *Exp. Cell Res.* 216:169.
- Catley B; Moore S. y Stein W (1969). The carbohydrate moiety of bovine pancreatic deoxyribonuclease. *J. Biol. Chem.* 244(4):933-936.
- Chaturvedi V, Qin J, Denning M, Choubey D, Diaz M y Nickloff B (1999). Apoptosis in proliferating, senescent and immortalized keratinocytes *J. Biol. Chem.* 274:23358-23367.
- Chen C, Lu S y Liao T (2002). The distinctive functions of the two structural calcium atoms in bovine pancreatic deoxyribonuclease. *Prot. Science* 11:659-668.
- Chitrabamrung S, Rubin R y Tan E (1981). Serum deoxyribonuclease I and clinical activity in systemic lupus erythematosus. *Rheumatol. Int.* 1:55-60.
- Clark P y Eichhorn G (1974). A predictable modification of enzyme specificity selective alteration of DNA bases by metal ions to promote cleavage specificity by deoxyribonuclease. *Biochemistry* 13:5098-5102.
- Collins J, Schandl C, Young K, Verseley J y Willingham M (1997). Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. *J. Histochem. Cytochem.* 5:923-934.
- Cooper, E., Trautman, M. Y Laskowski, M. 1950 *Proc. Soc. Exptl. Med.* 73:219.
- Counis MF, Chaudun E, Simmonneau L y Courtois Y (1979). DNA repair in lens cells during chick embryo development. *Biochem. Biophys. Acta* 561:85-98.
- Counis MF, Chaudun E, Arruti C, Oliver L, Sanwal M, Courtois Y y Torriglia A (1998). Analysis of nuclear degradation during lens cell differentiation. *Cell Death Differ.* 5:251-261.
- Cunningham y Laskowski (1953). *BBA* 11:590-591.
- Dahm R (1999). Lens fibre cell differentiation. A link with apoptosis? *Ophthal. Res.* 31:163-183.
- Dahm R, Gribbon C, Quinlan R y Prescott A (1998). Changes in the nucleolar and coiled body compartments precede lamina and chromatin reorganization during fibre cell denucleation in the bovine lens. *Eur. J. Cell Biol.* 75:237-246.
- Dahm R y Prescott A (2002). Morphological changes and nuclear pore clustering during nuclear degradation in differentiating bovine lens fibre cells. *Ophthal. Res.* 34:288-294.
- Davis J, Manzi S, Yarboro C, Raire J, Mcinnes I, Averthelyi D, Sinicropo D, Hale V, Balow J, Austin H, Boumpas D y Klippel J (1999). Recombinant

- human DNase I (rhDNase) in patients with lupus nephritis. *Lupus* 8:68-76.
- Dini L, Coppola S, Ruzittu M y Ghibelli L (1996). Multiple pathways for apoptotic nuclear fragmentation. *Exp. Cell Res.* 223:340-347.
- Drew H (1984). Structural specificities of five commonly used DNA nucleases. *J. Mol. Biol.* 176:535-557.
- Drew H y Travers A (1984) DNA structural variation in the E. coli tryT promoter. *Cell* 37:491-502.
- Earnshaw W, Martins L y Kaufmann S (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Ann. Rev. Biochem.* 68:383-424.
- Eastman A (1994). Deoxyribonuclease II in apoptosis and the significance of intracellular acidification. *Cell Death Differen.* 1:7-9.
- Ehrenstein M (1999). Antinuclear antibodies and lupus: causes and consequences. *Rheumatology* 38:691-696.
- Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A y Nagata S (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391:43-50.
- Falcieri E, Zamai L, Santi S, Cinti C, Gobbi P, Bosco D, Cataldi A, Betts C y Vitale M (1994). The behaviour of nuclear domains in the course of apoptosis. *Histochem.* 102:221-231.
- Farsetti A, Desvergne B, Hallenbeck P, Robbins J y Nikodem V (1992). Characterization of the myelin basic protein thyroid hormone response element and its functions in the cortex of native and heterologous promoters. *J. Biol. Chem.* 267:15784-15788.
- Festy y Paoletti (1963). *Comptes Rendous de la Académie de Sciences, Paris*, 257:3682.
- Filipsky J, Leblanc J, Youdale T, Sikorska M y Walker P (1990). Periodicity of DNA folding in higher order chromatin structures. *EMBO J.* 9:1319-1327.
- Flaman J, Waridel F, Estericher A, Vannier A, Limacher J, Gilbert D, Iggo R y Frebourg T (1996). The human tumor supressor gene p53 is alternative spliced in normal cells. *Oncogene* 12(4):813-818.
- Funakoshi A, Tsubota Y, Wakasusi H, Ibayashi H y Takasi Y (1977). Purification and properties of human pancreatic deoxyribonuclease. *J. Biochem.* 82:1771-1777).
- Gao C, Bassnett S y Zelenka P (1995). Cyclin B, p34 and H1-kinase activity in terminally differentiating lens fiber cells. *Dev. Biol.* 169:185-194.
- Gavrieli Y, Sherman Y y Ben-Sasson S (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 119:493-501.
- Ghibelli L, Maresca V, Coppola S y Gualandi G (1995). Protease inhibitors block apoptosis at intermediate stages: a compared analysis of DNA fragmentation and apoptotic nuclear morphology. *Febs Lett* 377:9-14.
- Graves J, Draves K, Gotoh Y, Krebs E, Clark E (2001). Both phosphorylation and caspase-mediated cleavage contribute to regulation of the Ste20-like

- protein kinase Mst1 during CD95/Fas-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 276:14909-14915.
- Graw J, Liebstein A (1993). DNase activity in murine lenses: implications for cataractogenesis. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 231(6):354-358.
- Greene L, Hirs C y Palade G (1963). On the protein composition of bovine pancreatic zymogen granules. *J. Biol. Chem.* 238:2054-2064.
- Gueth-Hallonet C, Weber K y Osborn M (1997). Cleavage of the nuclear matrix protein NuMa during apoptosis. *Exp. Cell Res.* 233:21-24.
- Hamai Y, Fukui H, Kuwabara T (1974). Morphology of hereditary mouse cataract. *Exp. Eye Res.* 18:537-546.
- Hart S, Haslett C y Dransfield I (1996). Recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Experientia* 52:950-956.
- Hart G, Brew K, Grant G, Bradshaw A y Lennarz W (1979). Primary structural requirements for the enzymatic formation of the N-glycosidic bond in glycoproteins. Studies with natural and synthetic peptides. *J. Biol. Chem.* 254:9747-9753.
- He, H, Gao C, Vrensen G y Zelenka P (1998). Transient activation of cyclin B/Cdc2 during terminal differentiation of lens fiber cells. *Develop. Dynam.* 211:26-34.
- Hess J y FitzGerald P (1996). Lack of Dnase I mRNA sequences in murine lenses. *Mol. Vis.* 2:8.
- Hetts S (1998). To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA* 279:300-307.
- Hewish D y Burgoyne L (1973). Chromatin sub-structure. The digestion of chromatin DNA at regularly spaced sites by a nuclear deoxyribonuclease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 52:504-510.
- Hitchcock S (1980). Actin deoxyribonuclease I interaction. *J. Biol. Chem.* 255:5668-5673.
- Hitchcock S, Carison L y Lindberg U (1976). Depolymerization of F-actin by deoxyribonuclease I. *Cell* 7:531-542.
- Hosomi O, Yasuda T, Takeshita H, Nakajima T, Nakashima Y, Hanaoka Y y Kishi K (1999). *Xenopus laevis* pancreatic DNase I: purification and immunological characterization. *Exp. Clin Immunogenet.* 16:117-123.
- Hsiao Y, Ho H, Wang W, Tam M y Liao T (1997). Purification and characterization of tilapia deoxyribonuclease I-primary structure and cDNA sequence. *Eur. J. Biochem.* 249:786-791.
- Hugli T y Stein W (1971). Involvement of a tyrosine residue in the activity of bovine pancreatic deoxyribonuclease A. *J. Biol. Chem.* 246:7197-7200.
- Iida R, Yasuda T, Takeshita H, Tsubota E, Yuasa I, Nakajima T y Kishi K (1996). Identification of the nucleotide substitution that generates de fourth polymorphic site in human deoxyribonuclease I (DNase I). *Hum. Genet.* 98:415-418.
- Iida R, Yasuda T, Aoyama M, Tsubota E, Kobayashi M, Yuasa I, Matsuki T y Kishi K (1997). The fifth allele of the human deoxyribonuclease I (DNase I) polymorphism. *Electrophoresis* 18:1936-1939.

- Imagawa M, Chiu R y Karin M (1987). Transcription factor AP-2 mediates induction by two different signal transduction pathways: protein kinase C and cAMP. *Cell* 51:251-260.
- Ishizaki Y, Jacobson M y Raff M (1998). Role for caspases in lens fiber differentiation. *J. Cell Biol.* 140:153-158).
- Jacobson M, Weil M y Raff M (1997). Programmed cell death in animal development. *Cell* 88:347-354.
- Jones G y Bowen I (1979). The fine structural localization of acid phosphatase in pore cells of embryonic and newly hatched *Deroceras reticulatum* (Pulmonata:Stylommatophora). *Cell Tissue Res.* 204:253-265.
- Junowicz E y Spencer J (1973a). Studies on bovine pancreatic deoxyribonuclease A. I. General properties and activation with different bivalent metals. *BBA* 312(1):72-84.
- Junowicz E y Spencer J (1973b). Studies on bovine pancreatic deoxyribonuclease A. II. The effect of different bivalent metals on the specificity of degradation of DNA. *BBA.* 312(1):85-102).
- Kabsch W, Mannherz H, Suck D, Pai E y Holmes K (1990). Atomic structure of the actin:DNase I complex. *Nature* 347:37-44.
- Kaplan H, Walphy J y Lennarz W (1987). Oligosaccharyl transferase:the central enzyme in the pathway of glycoprotein assembly. *BBA* 906:161-173.
- Kasturi L, Eshleman J, Wunner W y Shakin-Eshleman S (1995). The hydroxy amino acid in an Asn-Xaa- Ser/Thr sequon can influence N-linked core glycosylation efficiency and the level of expression of a cell glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 270:14756-14761.
- Kerr J, Wyllie A y Currie A (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26:239-257.
- Kevil C, Walsh I, Laroux S, Kalogeris T, Grisham M y Alexander J (1997). An improved rapid northern protocol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 238:277-279.
- Kihlmark M, Imreh G y Hallberg E (2001). Sequential degradation of proteins from the nuclear envelope during apoptosis. *J. Cell Science* 114:3643-3653.
- Kishi K, Yasuda T y Takeshita H (2001). DNase I: structure, function and use in medicine and forensic science. *Legal Med.* 3:69-83.
- Kobyletzki G, Heine O, Stephan H, Pieck C, Stucker M, Hoffman K, Altmeyer P y Mannherz H (2000). UVA1 irradiation induces deoxyribonuclease dependent apoptosis in cutaneous T-cell lymphoma in vivo. *Photoderm. Photoimmunol. Photomed.* 16:271-277.
- Kornfeld R y Kornfeld S (1985). Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Ann. Rev. Biochem.* 54:631-664.
- Kraehenbuhl J, Racine L y Jamieson J (1977). Immunocytochemical localization of secretory proteins in bovine pancreatic exocrine cells. *J. Cell Biol.* 72:406-423.

- Kreuder V, Diecjhoff J, Sittig M y Mannherz H (1984). Isolation, characterization and crystallization of deoxyribonuclease I from bovine and rat parotid gland and its interaction with rabbit skeletal muscle actin. *Eur. J. Biochem.* 139:389-400.
- Kunitz M (1948). Isolation of crystalline desoxyribonuclease from beef pancreas. *Science* 108:19-20.
- Kunitz M (1950a). Crystalline desoxyribonuclease I. Isolation and general properties. Spectrometric method for the measurement of desoxyribonuclease activity. *J. Gen. Physiol.* 33:349-362.
- Kunitz M (1950b). Crystalline desoxyribonuclease. II. Digestion of thymus nucleic acid. The kinetics of the reaction. *J. Gen Physiol.* 33:363-377.
- Kuwabara T (1975). The maturation of the lens cell: a morphological study. *Exp. Eye Res.* 20:427-443.
- Kuwabara T y Imaizumi M (1974). Denucleation process of the lens. *IOVS* 13:973-981.
- Kyprianou N, English H y Isaacs J (1990). Programmed cell death during regression of PC-82 human prostate cancer following androgen ablation. *Cancer Res.* 50:3748-3753.
- Lacks S (1981). Deoxyribonuclease I in mammalian tissues. *J. Biol. Chem.* 256:2644-2648.
- Laemmli U (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Laemmli U, Kas E, Poljak L y Adachi Y (1992). Scaffold-associated regions: cis-acting determinants of chromatin structural loops and functional domains. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2(2):275-285.
- Lagarkova M, Iarovaia O y Razin S (1995). Large-scale fragmentation of mammalian DNA in the course of apoptosis proceeds via excision of chromosomal DNA loops and their oligomers. *J. Biol. Chem.* 270:20239-20241.
- Lahm A y Suck D (1991). DNase I-induced DNA conformation: 2^a structure of a DNase I:octamer complex. *J. Mol Biol.* 221:645-667.
- Lazarides E y Lindberg U (1974). Actin is the naturally occurring inhibitor of deoxyribonuclease I. *PNAS* 71:4742-4746.
- Lazebnik Y, Cole S, Cooke C, Nelson W y Earnshaw W (1993). Nuclear events of apoptosis in vitro in cell-free mitotic extracts: a model system for analysis of the active phase of apoptosis. *J. Cell Biol.* 123:7-22.
- Lazebnik Y, Kaufmann S, Desnoyers S, Poirier G y Earnshaw W (1994). Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature*, 371:346-347.
- Liao T (1974). Bovine pancreatic deoxyribonuclease D. *J. Biol. Chem.* 249(8):2354-2356.
- Liao T, Salnikow J, Moore S y Stein W (1973). Bovine pancreatic deoxyribonuclease A. *J. Biol. Chem.* 248:1489-1495.
- Lindberg U (1967). Molecular weight and aminoacid composition of deoxyribonuclease I. *Biochem.* 6:335-342.

- Liu X, Li P, Widlak P, Zou H, Luo X, Garrard W y Wang X (1998). The 40-kDa. subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *PNAS* 95:8461-8466.
- Liu Q, Ribocco M, Hou Y, Walker R y Sikorska M (1997). DNase I primary transcript is alternatively spliced in both normal and apoptotic cells: no evidence of up-regulation in apoptosis. *DNA Cell Biol* 16:911-918.
- Liu X, Zhou H, Widlak P, Garrard W y Wang X (1999). Activation of the apoptotic endonuclease DFF40 (caspase activated DNase or nuclease). Oligomerization and direct interactions with histone H1. *J. Biol. Chem.* 274:13836-13840.
- Liu X, Zou H, Slaughter C y Wang X (1997). DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89:175-184.
- Lizarraga B, Sanchez D, Gil A y Melgar E (1978). The role of Ca²⁺ on the pH-induced hydrodynamic changes of bovine pancreatic deoxyribonuclease A. *J. Biol. Chem.* 253:3191-3195.
- Lomonosoff G, Butler P y Klug A (1981). Sequence-dependent variation in the conformation of DNA. *J. Mol. Biol.* 149:745-760.
- Loukkamaki M, Servomaa K y Rytamäki T (1993). Onset of chromatin fragmentation in chloroma cell apoptosis is highly sensitive to UV and begins at non-B DNA conformation. *Int J Radiat Biol.* 1993 Feb;63(2):207-13.
- Love J y Hewitt R (1979). The relationship between human serum and human pancreatic Dnase I. *J. Biol. Chem.* 254:12588-12594.
- Lundblad R, Hoffman S, Noyes C y Kingdon H (1977). Purification and partial characterization of deoxyribonuclease I from bovine parotid gland. *J. Dent. Res.* 56:320-326.
- Macanovic M y Lachmann P (1997). Measurement of deoxyribonuclease I (DNase I) in the serum and urine of systemic erythematosis (SLE)-prone NZB/NZW mice by a new radial enzyme diffusion assay. *Clin. Exp. Immunol.* 108:220-226.
- Madaio M, Fabbi M, Tiso M, Daga A y Puccetti A (1996). Spontaneously produced anti-DNA/Dnase I autoantibodies modulates nuclear apoptosis in living cells. *Eur. J. Immunol.* 26:3035-3041.
- Maisel I. The ocular lens. New York, NY Marcel Dekker.
- Maley F, Trimble R, Tarentino A y Lummer T (1989). Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases. *Anal. Biochem.* 180:195-204.
- Malferrari G, Mirabella M, D'Alessandra Y, Servidei S y Biunno I (2001). Deletion polymorphism of DNASE1L1, an X-linked DNase I-like gene, in acid maltase deficiency disorders. *Exp. Mol. Pathol.* 70(2):173-174.
- Mannherz H, Barrington-Leigh J, Leberman R y Pfrang H (1975). A specific 1:1 G-actin:Dnase I complex formed by the action of Dnase I on F-actin. *FEBS. Lett.* 60:34-38.

- Matsuda M y Ogoshi H (1966). Specificity of DNase I. Estimulation of nucleotide present at the 5'-phosphate terminus of a limit digest od DNA by DNase I. *J. Biochem.* 59:230-235.
- Mc Carty M (1946). Purification and properties of desoxyribonuclease isolated from beef pancreas. *J. Gen. Physiol.* 29:123-139.
- McIlroy D, Tanaka M, Skahira H, Fukuyama H, Suzuki M, Yamamura K, Ohsawa Y, Uchiyama Y y Nagata S (2000). An auxiliary mode of apoptotic DNA fragmentation provided by phagocytes. *Genes Dev.* 14:549-558.
- Meister A, Weinrich S, Nelson C y Rutter W (1989). The chymotrypsin enhancer core. Specific factor binding and biological activity. *J. Biol. Chem.* 264:20744-20754.
- Melgar E y Goldthwait D (1968). Deoxyribonucleic acid nucleases. *J. Biol. Chem.* 243:4409-4416.
- Merdes A y Cleveland D (1998). The role of NuMA in the interphase nucleus. *J. Cell Sci.* 111:71-79.
- Mirsky A y Silverman B (1972a). Blocking by histones of accessibility to DNA in chromatin. *PNAS* 69:2115-2119.
- Mirsky A y Silverman B (1972b). Blocking by histones of accessibility to DNA in chromatin: addition of histones. *PNAS* 69:3243-3246.
- Modak S, Borstel R y Bollum F (1969). Terminal lens cell differentiation II. Template activity of DNA during nuclear degeneration. *Exp. Cell Res.* 56:105-113.
- Modak S y Persons B (1971). RNA synthesis during lens cell differentiation. *Exptl. Cell Res.* 64:473-476.
- Morita A, Werfel T, Stege H, Ahrens C, Karmann K, Grewe M, Grether-Beck S, Ruzicka T, Kapp A, Klotz L, Sies H y Krutmann J (1997). Evidence that singlet oxygen-induced human T helper cell apoptosis is the basic mechanism of ultraviolet-A radiation phototherapy. *J. Exp. Med.* 186:1763-1768.
- Mount 1982 A catalogue of splice junctions sequences. *Nuc. Acids Res.* 10:459.
- Muel A, Chaudun E, Courtois Y, Modak S y Counis MF (1986). Nuclear endogenous Ca²⁺-dependent endodeoxyribonuclease in differentiationg chick embryonic lens fibres. *J. Cell Phys.* 127:167-174.
- Nadano D, Yasuda T y Kishi K (1993). Measurement of deoxyribonuclease I activity in human tissues and body fluids by a single radial enzyme-diffusion method. *Clin. Chem.* 39:448-452.
- Nagata S (2000). Apoptotic DNA fragmentation. *Exp. Cell Res.* 256:12-18.
- Nakashima Y, Yasuda T, Takeshita H, Nakajima T, Hosomi O, Mori S y Kishi K (1999). Molecular biochemical and immunological studies of hen pancreatic deoxyribonuclease I. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31:1315-1326.
- Napirei M, Karsunky H, Zevnik B, Stephan H, Mannherz H y Moroy T (2000). Features of systemic lupus erythematosus in DNase I deficient mice. *Nature Genetics* 25:177-181.

- Neamati N, Fernandez A, Wright S, Kiefer J y McConkey DJ (1995). Degradation of lamin B1 precedes oligonucleosomal DNA fragmentation in apoptotic thymocytes and isolated thymocyte nuclei J. Immunol. 154:3788- 3795.
- Nishikawa A, Gregory W, Frenz J, Cacia J y Kornfeld S (1997). The phosphorylation of bovine DNase I Asn-linked oligosaccharides is dependent on specific lysine and arginine residues. J. Biol. Chem. 272:19408-19412.
- Nishikawa A y Mizuno S (2001). The efficiency of N-linked glycosylation of bovine DNase I depends on the Asn-Xaa-Ser/Thr sequence and the tissue of origin. Biochem. J. 355:245-248.
- Nishikawa A, Nande A, Gregory W, Frenzi J y Kornfeld S (1999). Identification of aminoacids that modulate mannose phosphorylation of mouse DNase I, a secretory glycoprotein. J. Biol. Chem. 274:19309-19315.
- Nixon J, Bishop J y Branshaw D (1992). The design and biological properties of potent and selective inhibitors of protein kinase C. Biochem. Soc. Trans. 12:413-424.
- Oberhammer F, Hochegger K, Froschl G, Tiefenbacher R y Pavelka M (1994). Chromatin condensation during apoptosis is accompanied by degradation of lamin A+B, without enhanced activation of cdc2 kinase. J. Cell Biol. 126:827-837.
- Oberhammer F, Wilson J, Dive C, Morris I, Hickman J, Wakeling A, Walker P y Sikorska M (1993). Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. EMBO J. 12:3679-3684.
- Odaka C y Mizuochi T (1999). Role of macrophage lysosomal enzymes in the degradation of nucleosomes of apoptotic cells. J. Immunol. 163:5346-5352.
- Oefner C y Suck D (1986). Crystallographic refinement and structure of DNase I at 2 Å resolution. J. Mol. Biol. 192:605-632.
- Oliveri M, Daga A, Cantoni C, Lunardi C, Millo R y Puccetti A (2001). DNase I mediates internucleosomal DNA degradation in human cells undergoing drug-induced apoptosis. Eur. J. Immunol. 31:743-751.
- Oppenheim R (1991). Cell death during development of nervous system. Ann. Rev. Neurosci. 14:453-501.
- Pan C, Ulmer J, Herzka A y Lazarus R (1998). Mutational analysis of human Dnase I at the DNA binding interface: Implications for DNA recognition, catalysis, and metal ion dependence. Prot. Science 7:628-636.
- Pandey S, Walker P y Sikorska M (1994). Separate pools of endonuclease activity are responsible for internucleosomal and high molecular mass DNA fragmentation during apoptosis. Biochem. Cell Biol. 72:625-629.
- Parrish J, Ciccodicola A, Wehert M, Cox G, Chen E y Nelson D (1995). A muscle-specific Dnase I-like gene in human Xq28. Hum. Molec. Genet. 4:1557-1564.

- Paudel H y Liao T (1986). Purification, characterization and the complete amino acid sequence of porcine pancreatic deoxyribonuclease. *J. Biol. Chem.* 261:16006-16011.
- Peitsch M, Irmeler M, French L y Tschopp J (1995). Genomic organization and expression of mouse deoxyribonuclease I. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 207:62-68.
- Peitsch M, Mannherz H y Tschopp J (1994). The apoptosis endonucleases: cleaning up after death. *Trends Cell Biol.* 4:37-41.
- Peitsch M, Polzar B, Stephan H, Crompton T, McDonald H, Mannherz H y Tschopp J (1993). Characterization of the endogenous deoxyribonuclease involved in nuclear DNA degradation during apoptosis (programmed cell death). *EMBO J.* 12:371-377.
- Pergolizzi R, Apperto V, Bosetti A, DeBellis G, Rovida E y Biunno I (1996). Cloning of a gene encoding a DNase I-like endonuclease in the human Xq28 region. *Gene* 168:267-270.
- Piatigorsky J (1981). Lens differentiation in vertebrates. A review of cellular and molecular features. *Different.* 19:134-153.
- Pisetsky D (1998). Anti-DNA antibodies in systemic lupus erythematosus: a case of mistaken identity? *J. Rheumatol.* 25:195-197.
- Pless D y Lennarz W (1977). Enzymatic conversion of proteins to glycoproteins. *PNAS.* 74:134-138.
- Polzar B y Mannherz H (1990). Nucleotide sequence of a full length cDNA clone encoding a deoxyribonuclease I (DNase I) from rat parotid gland. *Nuc. Acid Res.* 18:7151.
- Polzar B, Peitsch M, Loos R, Tschopp J y Mannherz H (1993). Overexpression of deoxyribonuclease I transfected into COS-1 cells: its distribution during apoptotic cell death. *Eur. J. Cell Biol.* 62:397-405.
- Polzar B, Zanotti S, Stephan H, Rauch F, Peitsch M, Irmeler M, Tschopp J y Mannherz H (1994). Distribution of deoxyribonuclease I in rat tissues and its correlation to cellular turnover and apoptosis (programmed cell death). *Eur. J. Cell Biol.* 64:200-210.
- Potten C (1992). The significance of spontaneous and induced apoptosis in the gastrointestinal tract of mice. *Cancer Metastasis Rev.* 11:179-195.
- Poulos T y Price P (1972). Some effects of calcium ions on the structure of bovine pancreatic deoxyribonuclease A. *J. Biol. Chem.* 247:2900-2904.
- Price P (1975). The essential role of calcium in the activity of bovine pancreatic deoxyribonuclease. *J. Biol. Chem.* 250:1981-1986.
- Price P (1972). Characterization of Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺ binding to bovine pancreatic deoxyribonuclease A. *J. Biol. Chem.* 247:2895-2899.
- Price P, Liu T, Stein W y Moore S (1969a). Properties of chromatographically purified bovine pancreatic deoxyribonuclease. *J. Biol. Chem.* 244:917-923.
- Price P, Moore S y Stein W (1969b). Alkylation of a histidine residue at the active site of bovine pancreatic deoxyribonuclease. *J. Biol. Chem.* 244:924-928.

- Price P, Stein W y Moore S (1969c). Effect of divalent cations on the reduction and reformation of the disulfide bonds of deoxyribonuclease. *J. Biol. Chem.* 244:929-932.
- Ramaekers F, Osborn M, Schmid E, Weber K, Bloemendal H y Franke W (1980). Identification of the cytoskeletal proteins in lens-forming cells, a special epitheloid cell type. *Exp Cell Res.* 127:309-327.
- Rao L, Perez D y White E (1996). Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J. Cell Biol.* 135:1441-1455.
- Rauch F, Polzar B, Stephan H, Zanotti S, Paddenbergh R y Mannherz H (1997). Androgen ablation leads to an upregulation and intranuclear accumulation of deoxyribonuclease I in rat prostate epithelial cells paralleling their apoptotic elimination. *J. Cell Biol.* 137:909-923.
- Redman R y Sreebny L (1971). Morphologic and biochemical observations on the development of the rat parotid gland. *Dev. Biol.* 25:248-279.
- Reipert S, Reipert B, Hickman J y Allen T (1996). Nuclear pore clustering is a consistent feature of apoptosis in vitro. *Cell Death Differen.* 3:131-139.
- Robertson J, Orrenius S y Zhivotovsky B (2000). Review: Nuclear events in apoptosis. *J. Struct. Biol.* 129:346-358.
- Rodriguez A, Rodin D, Nomura H, Morton C Weremowicz S y Schneider M (1997). Identification, localization, and expression of two novel human genes similar to deoxyribonuclease I. *Genomics* 42:507-513.
- Rosenthal A y Lacks S (1977). Nuclease detection in SDS-polyacrilamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 80:76-90.
- Sahara S, Aoto M, Eguchi Y, Imamoto N, Yoneda Y y Tsujimoto T (1999). Acinus is a caspase-3-activated protein required for apoptotic chromatin condensation. *Nature* 401:168-73.
- Salnikow J, Liao T, Moore S y Stein W (1973). Bovine pancreatic deoxyribonuclease A. *J. Biol. Chem.* 248:1480-1485.
- Salnikow J, Moore S y Stein W (1970). Comparison of the multiple forms of bovine pancreatic deoxyribonuclease. *J. Biol. Chem.* 245:5685-5690.
- Salnikow J y Murphy D (1973). Bovine pancreatic deoxyribonucleases A and C. *J. Biol. Chem.* 248:1499-1501.
- Samejima K y Earnshaw W (1998). ICAD/DFF regulator of apoptotic nuclease is nuclear. *Exp. Cell Res.* 243:453-459.
- Sandilands A, Prescott A, Carter J, Hutcheson J, Quinlan R, Richards J y FitzGerald G (1995). Vimentin and CP49/filensin form distinct networks in the lens which are independently modulated during lens fibre cell differentiation. *J. Cell Sci.* 108:1397-1406.
- Sanguinetti C, DiasNeto E y Simpson A (1994). Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrilamide gels. *Biotech.* 17:914-921.
- Sanne J y Krueger K (1995). Aberrant splicing of rat steroid 17 alpha-hydroxylase transcripts. *Gene* 165:327-328.
- Sanwal M, Muel AS, Chaudun E, Courtois Y y Counis MF (1986). Chromatin condensation and terminal differentiation process in embryonic chicken lens in vivo and in vitro. *Exp. Cell Res.* 167:429-439.

- Schonbrunn A (1990). Somatostatin action in pituitary cells involves two independent transduction mechanisms. *Metabolism* 39:96-100.
- Shack (1957). *J. Biol. Chem.* 226:573.
- Shack y Bynum 1964 Interdependence of variables in the activation of deoxyribonuclease I. *J. Biol. Chem.* 239:3843-3848.
- Shack S, Capon D, Hellmiss R, Mosters S y Baker C (1990). Recombinant human DNase I reduces the viscosity of cystic fibrosis sputum. *PNAS* 87:9188-9192.
- Shakin-Eshelman S, Spitalnik S y Kasturi L (1996). The amino acid at the X position of Asn-X-Ser sequon is an important determinant of N-linked core-glycosylation efficiency. *J. Biol. Chem.* 271:6363-6366.
- Scheidereit C, Geisse S, Westphal H y Beato M (1983). The glucocorticoid receptor binds to defined nucleotide sequences near the promoter of mouse mammary tumour virus. *Nature* 304:749-752.
- Shimada O, Ishikawa H, Tosaka-Shimada H, Yasuda T, Kishi K y Susuki S (1998a). Detection of deoxyribonuclease I along the secretory pathway on Paneth cells of human small intestine. *J. Histochem. Cytochem.* 46:833-840.
- Shimada O, Suzuki S, Tosaka-Shimada H y Ishikawa H (1998b). Detection of deoxyribonuclease I in a hormone-secretory pathway of pituitary cells in human and rats. *Cell Struct. Funct.* 23:49-56.
- Shiokawa D, Ohya H, Yamada T y Tanuma S (1997). Purification and properties of DNase gamma from apoptotic rat thymocytes. *Biochem. J.* 326:675-681.
- Shiokawa D y Tanuma S (1998) Molecular cloning and expression of a cDNA encoding an apoptotic endonuclease DNase gamma. *Biochem. J.* 332:713-720.
- Shiokawa D y Tanuma S (2001). Characterization of human DNase I family endonucleases and activation of DNase gamma during apoptosis. *Biochem.* 40:143-152.
- Silberstein S y Gilmore R (1996). Biochemistry, molecular biology and genetics of the oligosaccharyltransferase. *FASEB J.* 10:849-858.
- Sivakumar S, Mirels L, Miranda A y Hand A (1998). Secretory protein expression patterns during rat parotid gland development. *Anat. Record* 252:485-497.
- Smith C (1953). The inactivation of deoxyribonuclease by electron bombardment, deuteron bombardment and heat. *Arch. Biochem. Biophys.* 45:83.
- Staynov D (2000). DNase I digestion reveals alternating asymmetrical protection of the nucleosome by the higher chromatin order. *Nuc. Acid Res.* 28:3092-3099.
- Suck D (1994). DNA recognition by DNase I. *J Mol. Recognit.* 7(2):65-70.
- Suck D, Lahm A y Oefner C (1988). Structure refined to 2 Å of the nicked DNA octanucleotide complex with DNase I. *Nature* 332:464-468.
- Suck D, Oefner, C y Kabsch W (1984) Three-dimensional structure of bovine pancreatic DNase I at 2.5 Å resolution. *EMBO J.* 3(10):2423-2430.

- Takeshita H, Mogi K, Yasuda T, Nakajima T, Mori S, Hoshino T y Kishi K (2000). Mammalian deoxyribonuclease I are classified into three types: pancreas, parotid and pancreas-parotid (mixed), based on differences in their tissue concentrations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269:481-484.
- Takeshita H, Yasuda T, Iida R, Nakajima T, Mori S, Mogi K, Kaneko Y y Kishi K (2001). Amphibian DNases I are characterized by a C-terminal end with a unique , cysteine-rich stretch and by the insertion of a serine residue into the Ca^{2+} -binding site. *Biochem. J.* 357:473-480.
- Takeshita H, Yasuda T, Nadano D, Iida R y Kishi K (1995). Deoxyribonuclease I from rat urine: affinity purification, characterization and immunological studies *J. Biochem.* 118:932-938.
- Tamaoki T, Nomoto H, Takahashi I, Kato Y, Marimoto M y Tomita F (1986). Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/ Ca^{++} dependent protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 135:397-402.
- Tenjo E, Sawazaki K, Yasuda T, Nadano D, Takeshita H, Iida R y Kishi K (1993). Salivary deoxyribonuclease I polymorphism separated by polyacrylamide gel-isoelectric focusing and detected by the dried agarose film overlay method. *Electrophoresis* 14:1042-1044.
- Terasaki M, Song J, Wong J y Chen L (1984). Localization of endoplasmic reticulum in living and glutaraldehyde-fixed cells with fluorescent dyes. *Cell* 38:101-108.
- Torriglia A, Chaudun E, Chany-Fournier F, Jeanny JC, Courtois Y y Counis MF (1995). Involvement of Dnase II in nuclear degeneration during lens cells differentiation. *J. Biol. Chem.* 270:28579-28585.
- Towbin H, Staehelin T y Gordon J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *PNAS* 76:4350-4354.
- Tullis R y Price P (1974). Effect of calcium and magnesium on the ultraviolet spectrum of bovine pancreatic deoxyribonuclease A. *J. Biol. Chem.* 249:5033-5037.
- Ucker D, Obermiller P, Eckhart W, Apgar J, Berger N y Meyers J (1992). Genome digestion is a dispensable consequence of physiological cell death mediated by cytotoxic T lymphocytes. *Mol. Cell. Biol.* 12:3060-3069.
- Ura S, Masayama N, Graves J, Gotoh Y (2001). Caspase cleavage of MST1 promotes nuclear translocation and chromatin condensation. *PNAS* 98:10148-10153.
- van Leyen K, Engelhardt H y Wiedmann M (1998). A function for lipoxygenase in programmed organelle degradation. *Nature* 395:392-395.
- Varki A (1993). Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* 3:97-130.
- Vaux D y Korsmeyer S (1999). Cell death in development. *Cell* 96:245-254.
- von Figura K y Hasilik A (1986). Lysosomal enzymes and their receptors. *Ann. Rev. Biochem.* 55:167-193.

- Vrensen G, Graw J, De Wolf A (1991). Nuclear break down during terminal differentiation of primary lens fibers in mice: A transmission electron microscopic study. *Exp. Eye Res.* 52:647-659.
- Walker J (1994). The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. 32:5-8.
- Walker P y Sikorska M (1994). Endonuclease activities, chromatin structure, and DNA degradation in apoptosis. *Biochem. Cell Biol.* 72(11-12):615-623.
- Walker P, Smith C, Youdale, Leblanc J, Whitfield J y Sikorska M (1991). Topoisomerase II-reactive chemotherapeutic drugs induce apoptosis in thymocytes. *Cancer Res.* 51:1078-1085.
- Weaver V, Carson C, Walker P, Chaly N, Lach B, Raymond Y, Brown D y Sikorska M (1996). Degradation of nuclear matrix and DNA cleavage in apoptotic thymocytes. *J. Cell Sci.* 109:45-56.
- Wyllie A (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284:555-556.
- Wilson M, Close T y Trosko J (2000). Cell population dynamics (apoptosis, mitosis and cell- cell communication) during disruption of homeostasis. *Exp. Cell Res.* 254:257-268.
- Wride M (2002). Minireview: Apoptosis as seen through a lens. *Apoptosis* 5:203-209.
- Wride M., Parker E., Sanders E. 1999 Members of the Bcl-2 and caspase families regulate nuclear degeneration during chick lens fibre differentiation. *Dev. Biol.* 213:142-156.
- Wride M y Sanders E (1998). Nuclear degeneration in the developing lens and its regulation by TNF α . *Exp. Eye Res.* 66:371-383.
- Yanase K, Smith R, Puccetti A, Jaret L y Madaio M (1997). Receptor-mediated cellular entry of nuclear localizing anti-DNA antibodies via myosin 1. *J. Clin. Invest.* 100(1):25-31.
- Yao K, Godwin A, Johnson C y O'Dwyer P (1996). Alternative splicing and differential expression of DT-diaphorase transcripts in human colon tumors and in peripheral mononuclear cells in response to mytomicin C treatment. *Cancer Res.* 56:1731-1736.
- Yasuda T, Awazu S, Sato W, Iida R , Tanaka Y y Kishi K (1990). Human genetically polymorphic deoxyribonuclease: purification, characterization and multiplicity of urine deoxyribonuclease I. *J. Biochem.* 108:393-398.
- Yasuda T, Kishi K, Yanagawa Y y Yoshida A (1995). Structure of the human deoxyribonuclease I (Dnase I) gene: identification of nucleotide substitution that generates its classical genetic polymorphism *Ann. Hum. Genet.* 59:1-15.
- Yasuda T, Mizuta K, Ikehara Y y Kishi K (1989). Genetic Analysis of Human deoxyribonuclease I by Immunoblotting and the zymogram method following isoelectric focusing. *Anal. Biochem.* 183:84-88.

- Yasuda T, Nadano D, Iida R, Takeshita H, Lane S, Callen D y Kishi K (1995). Chromosomal assignment of the human deoxyribonuclease I gene, DNase I to band 16p13.3 using the polymerase chain reaction. *Cytogenet. Cell Genet.* 70:221-223.
- Yasuda T, Nadano D, Takeshita H, Tenjo E y Kishi K (1995). Molecular analysis of the third allele of human deoxyribonuclease I polymorphism. *Ann. Hum. Genet.* 59:139-147.
- Yasuda T, Nadano D, Takeshita H, Tenjo E, Sawazaki K, Ootani M y Kishi K (1995). The molecular basis for genetic polymorphism of human deoxyribonuclease I: identification of the nucleotide substitution that generates the fourth allele. *FEBS Lett.* 359(2-3):211-214.
- Yasuda T, Nadano D, Tenjo E, Takeshita H, Sawazaki K, Nakanaga M y Kishi K (1995). Genotyping of human deoxyribonuclease I polymorphism by the polymerase chain reaction. *Electrophoresis* 16(10):1889-1893.
- Yasuda T, Takeshita H, Iida R, Kogure S y Kishi K (1999). A new allele, DNASE1*6, of human deoxyribonuclease I polymorphism encodes an Arg to Cys substitution responsible for its instability. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260(1):280-283.
- Yasuda T, Takeshita H, Nakajima T, Hosomi O, Nakashima Y y Kishi K (1997). Rabbit DNase I: purification from urine, immunological and proteochemical characterization, nucleotide sequence, expression in tissues, relationships with other mammalian DNases I and phylogenetic analysis. *Biochem. J.* 325:465-473.
- Yasuda T, Takeshita H, Nakajima T, Mogi K, Kaneko Y, Ueki M, Iida R y Kishi K (2002). Abrupt pubertal elevation of DNase I gene expression in human pituitary glands of both sexes. *FEBS Lett.* 510:22-26.
- Yasuda T, Takeshita H, Ueki M, Iida R, Nakajima T, Mori S, Mogi K, Kaneko Y y Kishi K (2001). Tissue-specific in vivo inhibition of Dnase I gene expression by somatostatin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 283:287-291.
- Yosutomo K, Horiuchi T, Kagami S, Tsukamoto H, Hashimura C, Urushinara M y Kuroda Y (2001). Mutation of DNase I in people with systemic lupus erythematosus. *Nat. Genet.* 28:313-314.
- Young E y Sinsheimer R (1965). A comparison of the initial actions of spleen deoxyribonuclease and pancreatic deoxyribonuclease. *J. Biol. Chem.* 240:1274-1280.
- Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis H y Horvitz H (1993). The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 75(4):641-652.
- Zakeri Z, Quaglini D, Latham T y Lockshin R (1993). Delayed internucleosomal DNA fragmentation in programmed cell death. *FASEB J.* 7:470-478.
- Zanotti S, Polzar B, Stephan H, Doll U, Niessing J y Mannherz H (1995). Localization of deoxyribonuclease I gene transcripts and protein in rat

- tissues and its correlation with apoptotic cell elimination. *Histochem.* 103:369-377.
- Zeng Z, Parmelee D, Hyaw H, Coleman T, Su K, Zhang J, Gentz R, Ruben S, Rosen C y Li Y (1997). Cloning and characterization of a novel human DNase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 231(2):499-504.
- Zhang J, LeeH, Lou D, Bovin G y Xu M (2000). Lack of obvious 50 kilobase pair DNA fragments in DNA fragmentation factor 45-deficient thymocytes upon activation of apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 274(1): 225-229.
- Zhivotovsky B, Wade D, Gahm A, Orrenius S y Nicotera P (1994). Formation of 50 kbp chromatin fragments in isolated liver nuclei is mediated by protease and endonuclease activation. *FEBS Lett.* 351(2):150-154.
- Zimmerman L y Font R (1966). Congenital malformation of the eye: some recent advances in knowledge of the pathogenesis and histopathological characteristics. *JAMA* 196:684-692.