

Laboratorio de Bioquímica
Facultad de Farmacia
Barcelona

Inducción de ribonucleasas en hongos. IV. Especificidad enzimática *

por

C. M. Cuchillo **, J. M. Ventura, E. Concustell y V. Villar-Palasi

(Recibido para publicar el 11 de febrero de 1967)

La digestión del RNA de levadura por la ribonucleasa va acompañada de la formación progresiva de grupos ácidos libres sin liberación de ácido fosfórico mineral. Los productos de la reacción no son precipitables por el ácido acético glacial, ni por el ácido clorhídrico 0,5 M y dializan a través de las membranas semipermeables (12). Actualmente se sabe que la escisión de los enlaces 3', 5' diéster tal como se presentan en los ácidos ribonucleicos es catalizada por acción de las ribonucleasas mediante una etapa de transesterificación del enlace 5' éster. La hidrólisis subsiguiente del producto intermedio 2', 3' fosfato cíclico conduce únicamente a 3' monoésteres, indicando que el ataque del agua produce únicamente la rotura del enlace 2' éster (18).

La diferente especificidad mostrada por ribonucleasas de origen distinto respecto al tipo de base en la posición 3' del RNA ha constituido la base de los estudios dirigidos a la obtención de la estructura secuencial de diversos tipos de RNA (7, 20).

En el presente trabajo se estudia la especificidad de la ribonucleasa producida por inducción al cultivar *Pleospora* en medios de cultivo líquidos integrados por RNA amortiguado. En trabajos anteriores se han definido ya las condiciones inductivas (3, 4), purificación de la ribonucleasa (5) y las principales características cinéticas (6).

Material y métodos

NUCLEÓTIDOS Y RIBONUCLEASA. Las muestras de referencia de los mononucleósidos 2', 3' monofosfatos cíclicos y ribonucleasa de páncreas de buey 5 × × crist. se han obtenido de la casa *Serva (Heidelberg)*.

CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA. La preparación de las placas (10 × 20 cm) y

* Con una ayuda a la Investigación del Ministerio de Educación y Ciencia.

** Beneficiario de una Beca de Iniciación a la Investigación. Dirección actual: Department of Biochemistry, University College, London, Gower St, W.C.1.

20 x 20 cm) se ha realizado mediante un extendedor manual (*Atom, Barcelona*) desarrollándose los cromatogramas en cubetas de vidrio cerradas herméticamente. Como soporte de los cromatogramas se ha utilizado polietilenimino-celulosa (PEI-celulosa; *Serva, Heidelberg*) libre de yeso, y como eluyente se han utilizado los sistemas siguientes: Solvente I: Isopropanol, amoníaco, agua (65:10:25 v/v) (8). Solvente II: Sulfato amónico M, acetato sódico M, isopropanol (80:18:2 v/v) (9). Las placas se han preparado siguiendo la metódica propuesta por RANDEATH (13) añadiéndose un 2 % de sustancia verde fluorescente a 254 m μ (*Woelm*) como contraste. La observación de los cromatogramas se ha realizado con la ayuda de una lámpara ultravioleta provista de dos longitudes de onda «*Uvalom*» (*Atom, Barcelona*).

DIGESTIÓN DEL ÁCIDO RIBONUCLEICO. Una mezcla formada por 1 ml de RNA (6mg/ml) y 1 ml de ribonucleasa de *Pleospora* (6 un./ml) en amortiguador Tris/ClH 0,2 M, pH 7,5 se ha incubado a 37° C analizándose los productos resultantes por cromatografía monodimensional en placas de PEI-celulosa.

Resultados

CROMATOGRAFÍA DE MONONUCLEÓTIDOS CÍCLICOS. En la Tabla I se presentan los R_f que los cuatro mononucleósidos 2', 3' fosfatos cíclicos muestran en la cromatografía en placas de PEI celulosa con los sistemas solventes I y II.

DIGESTIÓN DEL ÁCIDO RIBONUCLEICO. Los productos resultantes de la digestión del RNA de levadura por la ribonucleasa de *Pleospora* se han analizado cromatográficamente, tomando muestras de 10 μ l a tiempos: 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 7 h, 8 h, 10 h y 24 h.

El análisis cromatográfico señala manchas características a nivel de adenosín

TABLA I

Valores de R_f de los mononucleótidos separados en cromatografía en placa PEI-celulosa.

Mononucleótido (cíclicos)	R_f	
	Solvente I*	Solvente II**
2',3'-adenosínmonofosfato .	0,53	0,68
2',3'-guanosínmonofosfato .	0,40	0,72
2',3'-citosínmonofosfato .	0,46	0,86
2',3'-uridínmonofosfato .	0,45	0,87

* Solvente I: isopropanol, amoníaco, agua (65:10:25 v/v).

** Solvente II: sulfato amónico M, acetato sódico M, isopropanol (80:18:2 v/v).

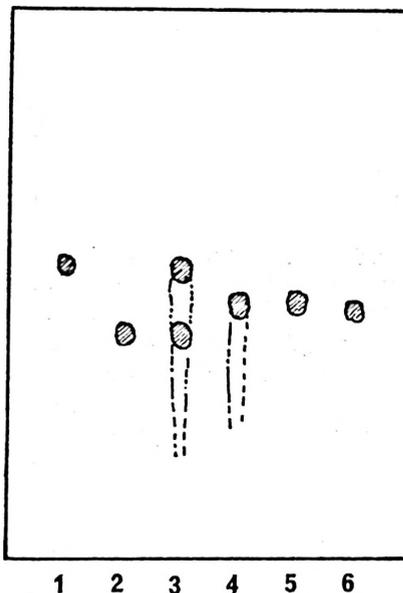


FIG. 1. Cromatografía en capa fina sobre placas de PEI-celulosa desarrollada con el solvente I. 1. Adenosín 2',3' fosfato cíclico. 2. Guanosín 2',3' fosfato cíclico. 3. Digesto de RNA por la ribonucleasa de *Pleospora*. 4. Digesto de RNA por la ribonucleasa A pancreática. 5. Citosín 2',3' fosfato cíclico. 6. Uridín 2',3' fosfato cíclico.

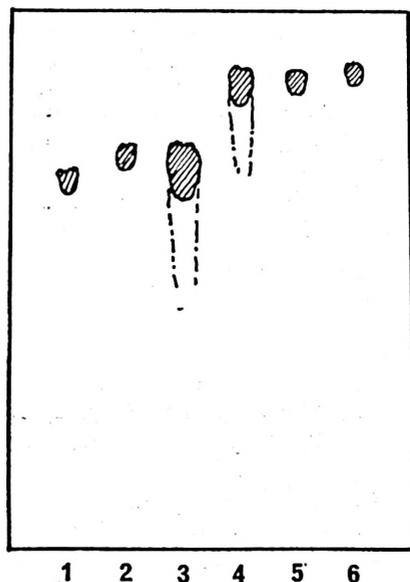


FIG. 2. Cromatografía en capa fina sobre placas de PEI-celulosa desarrollada con el solvente II. 1. Adenosín 2',3' fosfato cíclico. 2. Guanosín 2',3' fosfato cíclico. 3. Digesto de RNA por la ribonucleasa de *Pleospora*. 4. Digesto de RNA por la ribonucleasa A pancreática. 5. Citosín 2',3' fosfato cíclico. 6. Uridín 2',3' fosfato cíclico.

2',3' monofosfato cíclico y guanosín 2',3' monofosfato cíclico, siendo la segunda de mayor intensidad que la primera.

Paralelamente se han efectuado ensayos con ribonucleasa pancreática obteniéndose manchas características a nivel de los mononucleótidos pirimídicos cíclicos.

En las figuras 1 y 2 se representan esquemáticamente los resultados obtenidos.

Discusión

En el estudio de la cinética de la escisión de los enlaces 3',4' diéster de los ácidos ribonucleicos por acción de las ribonucleasas se han encontrado grandes

diferencias en la velocidad de reacción dependientes de la base que se encuentra en el enlace nucleosídico en la posición 3'. En este sentido la ribonucleasa A pancreática ataca solamente diésteres con nucleósidos pirimídicos en la posición 3' (1, 2, 9, 15, 16), mientras que las ribonucleasas de *Taka-Diastasa* aisladas por SATO y EGAMI (14) sólo escinden enlaces 3' diéster púricos, actuando la ribonucleasa T₁ sobre guanina y la ribonucleasa T₂ sobre adenina (10). Otras ribonucleasas como la de *Bacillus subtilis* (11) escinden todos los enlaces polinucleotídicos 3',5' diéster, pero la velocidad de reacción desciende en el orden ácido poliguanílico, ácido polinuosínico, ácido poliadénílico, ácido poliuracínico y ácido policitidílico con un factor de 10-100 entre cada uno de ellos (17). En general, existe una mayor afinidad por las bases pirimídicas en el enlace 3' en las ribonucleasas de origen animal y por las bases púricas en las de origen microbiano y fúngico (19).

En el caso de la ribonucleasa de *Pleospora* los cromatogramas desarrollados con los dos sistemas solventes muestran unas manchas claramente visibles coincidentes con los R_f de guanosina 2',3' fosfato cíclico y adenosina 2',3' fosfato cíclico siendo la primera de mayor intensidad que la segunda. Aunque en el cromatograma desarrollado con el solvente I aparecen manchas débiles a nivel de los R_f de los fosfatos 2',3' cíclicos de los nucleósidos pirimídicos, la ausencia de las mismas en los cromatogramas desarrollados con el solvente II excluyen la formación de los mismos durante el proceso de digestión del RNA por la ribonucleasa de *Pleospora*. Después de 24 horas de digestión del RNA por la ribonucleasa de *Pleospora* se ha observado que los únicos mononucleótidos existentes en el digesto total son los 3' mononucleótidos, es decir, la reacción de despolimerización del RNA transcurre

rre mediante la formación de un éster fosfórico 2',3' cíclico de los mononucleósidos guanosina y adenosina con posterior hidrólisis y formación de los mononucleósidos 3' fosfatos.

La digestión del RNA mediante la ribonucleasa A de páncreas de buey, cuya especificidad por las bases pirimídicas es bien conocida, se ha utilizado como comprobación de la bondad del método empleado.

Conclusiones

La ribonucleasa inducida de *Pleospora* presenta una especificidad marcada hacia las bases de tipo púrico en la posición 3' de los enlaces internucleosídicos en la cadena de RNA.

La reacción de despolimerización del RNA se produce a través de la formación de diésteres fosfóricos cíclicos de los mononucleósidos que contienen una base de tipo púrico.

Resumen

Mediante el análisis cromatográfico, sobre placas de PEI-celulosa, se han estudiado los productos resultantes de la reacción de despolimerización del RNA de levadura por la ribonucleasa inducida de *Pleospora*, habiéndose observado la formación de adenosín 2',3' monofosfato cíclico y guanosín 2',3' monofosfato cíclico como únicos productos intermediarios de la reacción. No se ha detectado la formación de compuestos análogos portadores de una base de tipo pirimídico.

Summary

Induction of ribonucleases in fungi. IV. Enzymatic specificity.

The products resulting of the depolymerization of yeast RNA by the action of the *Pleospora*-induced ribonuclease have been studied by means of thin la-

yer chromatography on PEI-cellulose plates. The formation of adenosine 2',3' cyclic monophosphate and guanosin 2',3' cyclic monophosphate as the only intermediary products of the reaction has been shown. No analogous compounds which bear a pyrimidine base have been detected.

Bibliografía

- BROWN, D. M., DEKKER, C. A., y TODD, A. R. : *J. Chem. Soc.*, 2715, 1952.
- BROWN, D. M., y TODD, A. R. : *J. Chem. Soc.*, 2040, 1953.
- CUCHILLO, C. M., CONCUSTELL, E., y VILLAR-PALASÍ, V. : *R. esp. Fisiol.*, 22, 19, 1966.
- CUCHILLO, C. M., VENTURA, J. M., CONCUSTELL, E., y VILLAR-PALASÍ, V. : Com. VII Cong. Soc. de Farmacia del Mediterráneo Latino, Burdeos, 1966 (en prensa).
- CUCHILLO, C. M., VENTURA, J. M., CONCUSTELL, E., y VILLAR-PALASÍ, V. : *R. esp. Fisiol.*, 23, 81, 1967.
- CUCHILLO, C. M., VENTURA, J. M., CONCUSTELL, E., y VILLAR-PALASÍ, V. : *R. esp. Fisiol.*, 23, 87, 1967.
- HOLLEY, R. W., EVERETT, G. A., MADISON, J. T., y ZAMIR, A. : *J. Biol. Chem.*, 240, 2122, 1965.
- JOSEFSSON, L., y LAGERSTED, S. : *Biochim. Biophys. Acta.*, 76, 471, 1963.
- MARKHAM, R., y SMITH, J. D. : *Biochem. J.*, 52, 552, 1952.
- NAVI-IADA, M., SATO-ASANO, K., y EGAMI, F. : *J. Biochem. (Tokyo)*, 46, 757, 1959.
- NISHIMURA, S. : *Biochim. Biophys. Acta*, 45, 15, 1960.
- PRIVAT DE GARILHE, M. : *Les Nucléases*, Hermann, París, 1964.
- RANDERATH, K. : *Dünnschicht Chromatographie*, Verlag Chemie, Weinheim, Bergstr., 1962.
- SATO, K., y EGAMI, F. : *J. Biochem. (Tokyo)*, 44, 753, 1957.
- SCHMIDT, G., CUBILES, R., ZOLLNER, N., HECHT, L. I., STRICKLER, N., SERAIDA-

- RIAN, K., SERAIDARIAN, M., y THANHAUSER, S. G. : *J. Biol. Chem.*, **205**, 767, 1951.
16. VOLKIN, E., y COHN, W. E. : *J. Biol. Chem.*, **205**, 767, 1953.
17. WHITFIELD, P. R., y WITZEL, H. : *Bioch. Biophys. Acta*, **72**, 362, 1963.
18. WITZEL, H. : en DAVIDSON, J. N., y COHN, W. E. : *Progress in Nucleic Acid Research*, Vol. II, Academic Press, New York, 221, 1963.
19. YONEDA, M. : *J. Biochem. (Tokyo)*, **55**, 481, 1964.
20. ZACHAU, H. G., y FELDMANN, H. : en DAVIDSON, J. N., y COHN, W. E. : *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, Vol. IV, Academic Press, New York, 217, 1965.

