Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Posgrado

Respuesta temprana de neurospora crassa a la inhibición parcial de la síntesis de proteínas

Grotewold, Erich

1988

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

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

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

Cita tipo APA:
Grotewold, Erich. (1988). Respuesta temprana de neurospora crassa a la inhibición parcial de la síntesis de proteínas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2152_Grotewold.pdf

Cita tipo Chicago:
Grotewold, Erich. "Respuesta temprana de neurospora crassa a la inhibición parcial de la síntesis de proteínas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1988. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2152_Grotewold.pdf

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

Rel. Nº 2152

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

RESPUESTA TEMPRANA DE *Neurospora crassa* A LA INHIBICION PARCIAL DE LA SINTESIS DE PROTEINAS

Erich Grotewold

Tesis para optar al título de

Doctor en Ciencias Químicas

Director: Dr. Norberto Daniel Judewicz

2.152
Ex 2

1988

Instituto de Investigaciones en

Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI)

CONICET

A Andrea

A Mis Padres

I N D I C E

Indice

Página

1. **RESUMEN**.....1

2. **ABREVIATURAS EMPLEADAS**.....3

3. **INTRODUCCION**.....6

3.1. *Neurospora crassa*.....7
3.1.1. Características generales.....7
3.1.2. Organización genética.....10
3.2. DISTINTAS CONDICIONES ADVERSAS CAPACES DE INDUCIR UNA RESPUESTA ADAPTATIVA.....14
3.2.1. Cicloheximida y otros inhibidores de la síntesis proteica.....14
3.2.2. Shock térmico y otros tipos de stress relacionados.....21
3.2.3. Ayuno o deprivación de determinados metabolitos.....26
3.3. OBJETIVOS DE ESTA TESIS.....35

4. **MATERIALES Y METODOS**.....37

4.1. REACTIVOS.....38
4.2. CONDICIONES DE USO DE ENZIMAS DE RESTRICCION Y MODIFICADORAS.....40
4.3. CEPAS Y CONDICIONES DE CULTIVO DE *Neurospora crassa*.....42
4.3.1. Cepas utilizadas.....42
4.3.2. Condiciones de cultivo y mantenimiento de las cepas.....42
4.4. CEPAS BACTERIANAS UTILIZADAS Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO.....44
4.5. MARCACION *in vivo* CON [^{35}S]MET.....48
4.5.1. Obtención de muestras para el estudio de la velocidad de incorporación de [^{35}S]Met.....48
4.5.2. Cuantificación de la [^{35}S]Met incorporada.....48
4.5.3. Obtención de muestras para el análisis de polipéptidos marcados por electroforesis en gel de acrilamida-SDS.....49
4.6. ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA CON SDS (PAGE-SDS).....50

Página

4.7. PURIFICACION DE ACIDOS NUCLEICOS.....52
4.7.1. Purificación de DNA de *Neurospora crassa*.....52
4.7.2. Purificación de RNA de *Neurospora crassa*.....53
4.7.2.1 Purificación de RNA total.....53
4.7.2.2 Cromatografía en oligo dT-celulosa.....54
4.7.2.3 Cuantificación de ácidos nucleicos.....56
4.7.2.3.1 Cuantificación de RNA.....56
4.7.2.3.2 Cuantificación de DNA.....56
4.7.2.4 Selección de RNA mensajeros específicos por hibridación con DNA clonado.....57
4.7.3. Purificación de DNA recombinante de los clones de fago λ.....59
4.7.4. Purificación de plásmidos.....60
4.7.5. Purificación de DNA simple cadena de fago M13...61
4.8. TRADUCCION *in vitro* DE RNA MENSAJERO.....63
4.9. SEPARACION DE ACIDOS NUCLEICOS EN AGAROSA.....64
4.9.1. Electroforesis de DNA y transferencia a filtros (*Southern blot*).....64
4.9.2. Purificación de fragmentos de DNA por electroforesis preparativa en geles de agarosa.....65
4.9.3. Electroforesis de RNA y transferencia a filtros (*Northern Blot*).....66
4.10. PREPARACION DE SONDAS RADIACTIVAS.....68
4.10.1. Síntesis de DNA copia (cDNA) a partir de RNA mensajero.....68
4.10.2. Marcado de DNA doble cadena.....69
4.10.3. Síntesis de DNA simple cadena marcado con [^{32}P].....70
4.10.4. Síntesis *in vitro* de RNA marcado con [^{32}P].....71
4.11. MAPEO DE RNA CON NUCLEASA S1.....73
4.12. AISLAMIENTO DE SECUENCIAS INDUCIBLES POR CICLOHEXIMIDA.....75
4.13. CONDICIONES DE HIBRIDACION.....77
4.14. ELECTROFORESIS DE ACIDOS NUCLEICOS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.....78
4.15. SECUENCIACION DE DNA.....79
4.15.1. Secuenciación de DNA por el método de dideoxinucleótidos.....79
4.15.2. Secuenciación de DNA por el método de Maxam y Gilbert.....79

Página

5.	**RESULTADOS Y DISCUSION**	80
5.1.	EFECTOS INMEDIATOS PRODUCIDOS *IN VIVO* POR BAJAS CONCENTRACIONES DE CICLOHEXIMIDA SOBRE LA VELOCIDAD DE SINTESIS PROTEICA	81
5.1.1.	Incorporación de L-^{35}S metionina	81
5.1.2.	Inducción temprana de polipéptidos	83
5.1.3.	Efecto de la cicloheximida en una cepa resistente al antibiótico	86
5.2.	EFECTOS DE LA PUROMICINA SOBRE LA INDUCCION DE PROTEINAS	90
5.3.	INDUCCION DE LOS POLIPEPTIDOS DE 31 KD Y 27 KD EN CULTIVOS EN FASE LOGARITMICA	92
5.4.	TRANSCRIPCION DIFERENCIAL PROMOVIDA POR CICLOHEXIMIDA	94
5.5.	CLONADO DE GENES INDUCIBLES POR CICLOHEXIMIDA	101
5.6.	CARACTERIZACION DE LOS GENES CLONADOS	102
5.7.	MAPEO DE RESTRICCION Y LOCALIZACION DE LOS GENES INDUCIBLES EN LOS CLONES E11BB Y E29BB	106
5.8.	MAPEO DE RESTRICCION DE LOS SUBCLONES	110
5.9.	ALELOS UNICOS CODIFICARIAN PARA LOS GENES CLONADOS	117
5.10.	ANALISIS DE LA UNIDAD TRANSCRIPCIONAL DEL GEN E11	121
5.10.1.	Localización y polaridad del gen E11	121
5.10.2.	Mapeo del extremo 3´ del gen E11	122
5.11.	SECUENCIACION Y ANALISIS DE LA SECUENCIA E11BBHH16	127
5.12.	EXPRESION TEMPORAL DE LOS GENES E11 Y E29	135
5.13.	INDUCCION DE LOS GENES CLONADOS POR OTRAS CONDICIONES DESFAVORABLES	137
5.13.1.	Efecto producido por ayuno	137
5.13.2.	Efectos producidos por alteraciones en la biosíntesis de poliaminas	140
5.13.3.	Otras condiciones estudiadas	148
6	**CONCLUSIONES**	150
7.	**BIBLIOGRAFIA**	154

1. RESUMEN

Resumen

La inhibición parcial de la síntesis proteica por cicloheximida o ayuno total de nutrientes en *Neurospora crassa*, produce la inducción de varios genes.

Se clonaron dos de ellos, cuyos transcriptos aparecen luego de apenas media hora de agregado el inhibidor. Se identificaron asimismo, los productos de traducción de estos genes y se demostró que la aparición de los mRNAs correspondientes está acompañada de su traducción. Las proteínas de 27 kD y 31 kD están entre las sintetizadas en mayor abundancia luego de la inhibición parcial de la síntesis proteica y corresponden a los productos de los genes clonados.

Estos genes serían inducibles por otras situaciones capaces de inhibir la síntesis proteica, como el agregado de puromicina o el ayuno por 12 horas en buffer fosfato. No serían, sin embargo, inducibles por shock térmico.

Uno de los genes se expresaría en forma constitutiva en una cepa que carece de la enzima ornitina decarboxilasa, cuando crece en presencia de espermidina. El clon genómico que contiene a este gen completo fue secuenciado totalmente.

2. ABREVIATURAS EMPLEADAS

Abreviaturas empleadas

En este trabajo han sido empleadas las siguientes abreviaturas:

AcONa.....acetato de sodio
ATP.....adenosina trifosfato
b.....bases
bisacrilamida.....N,N´-metilen-bis-acrilamida
BPB.....azul de bromofenol
BSA.....seroalbúmina bovina
CA.....cloroformo-alcohol isoamílico 24:1
cDNA.....DNA copia
Ci.....Curies (1 Ci≈2,2x10^{12}dpm)
cm.....centímetro
cpm.....cuentas por minuto
dATP.....deoxiadenosina trifosfato
dCTP.....deoxicitosina trifosfato
dGTP.....deoxiguanosina trifosfato
DFMO.....difluorometilornitina
DMF.....dimetilformamida
DNA.....ácido deoxirribonucleico
DNasaI.....deoxirribonucleasa I (de páncreas bovino)
DTT.....ditiotreitol
dTTP.....deoxitimidina trifosfato
EDTA.....etilendiamino tetraacetato de sodio
EtdBr.....bromuro de etidio
GTP.....guanosina trifosfato
HEPES.....ácido N-2-hidroxietilpiperazin-N-2-etansulfónico
h.....hora
IPTG.....isopropil tiogalactósido
kb.....miles de bases
kbp.....miles de pares de bases
min.....minuto

Abreviaturas empleadas

ml.....mililitro
MOPS.....ácido 3-(N-morfolino)propansulfónico
mRNA.....ácido ribonucleico mensajero
ODC.....enzima ornitina decarboxilasa
oligo dT.....ácido oligodeoxitimidílico
PAGE-SDS.....electroforesis en gel de acrilamida con SDS
pb.....pares de bases
PCA.....fenol-cloroformo-alcohol isoamílico 25:24:1
PEG.....polietilenglicol
PIPES.....ácido piperazin-N,N´-bis(2-etan-sulfónico)
polyA.....ácido poliadenílico
PVP.....polivinil pirrolidona
RNA.....ácido ribonucleico
RNasa A.....ribonucleasa A (de páncreas bovino)
rpm.....revoluciones por minuto
rRNA.....ácido ribonucleico ribosomal
SDS.....dodecil sulfato de sodio
T4 DNA ligasa.....DNA ligasa del fago T4
TCA.....ácido tricloroacético
Tris.....Tris(hidroximetil)aminometano
tRNA.....ácido ribonucleico de transferencia
U.....unidades de actividad enzimática
ufp.....unidades formadoras de placas
µl.....microlitro
X-gal.....5 bromo-4 cloro-3 indolil-β-D-galactopiranósido

3. INTRODUCCION

3.1. *Neurospora crassa*

3.1.1. Características generales

Neurospora crassa es un hongo perteneciente a la clase *Ascomycetes*. Fue estudiado por primera vez a mediados del siglo pasado y se lo encuentra principalmente en áreas tropicales y subtropicales, creciendo sobre árboles o restos celulósicos de plantas (Shear y Dodge, 1927).

Este hongo fue aislado por primera vez en Indiana (EE.UU.) y actualmente es muy utilizado en investigación a causa de la facilidad de su cultivo y mantenimiento. Constituye un modelo muy interesante para estudios de biología molecular por ser un organismo eucariótico de estructura muy simple y actualmente se posee un conocimiento bastante vasto de su genética.

El micelio de *N. crassa* es de tipo laxo, de aspecto mohoso, con conidias rosadas en forma de collar.

Las células constituyentes de las hifas son multinucleadas, variando el número de núcleos entre 3 y 100 por célula.

Posee mitocondrias idénticas a las de eucariotes superiores, retículo endoplasmático liso y rugoso, nucleolo y varias inclusiones citoplasmáticas.

Por fuera de la membrana existe una pared celular muy gruesa compuesta de distintos polímeros de glucosa, un proteoglicano, quitina y poligalactosamina y, en menor proporción, proteínas y lípidos (Työrinoja *et al*, 1974).

Como organismo heterótrofo puede crecer a máxima velocidad usando acetato, succinato, glicerol, glucosa y/u otros monosacáridos, así como una gran variedad de oligosacáridos como única fuente de carbono.

El nitrógeno es preferencialmente asimilado a partir de amonio, glutamato o glutamina, aunque es capaz de utilizar muchas otras fuentes secundarias, tales como nitrato, nitrito, purinas, proteínas, numerosos aminoácidos, acetamida e incluso acrilamida. El uso de estas fuentes de nitrógeno secundarias requiere la síntesis de enzimas catabólicas o la activación de otras preexistentes.

Requiere, además, de unos pocos oligoelementos como ser, sales de zinc, manganeso, cobalto, etc., y una única vitamina, la biotina.

El crecimiento vegetativo es óptimo entre 25 y 34°C con un tiempo promedio para cada división de aproximadamente 3 horas, dependiendo del estadío y las condiciones metabólicas del cultivo.

Neurospora crassa puede crecer indefinidamente en forma vegetativa y sus formas de reproducción consisten en tres tipos de esporas, dos asexuales, macro y microconidias, y una sexual (ascosporas).

Las macroconidias poseen pared celular gruesa, sin poros, y son esporas durmientes multinucleadas (Huebschman, 1952) que pueden resistir tanto desecación (Ogata, 1962), como calor, congelamiento y acidez (Strauss, 1958; Graham, 1967). Se desarrollan sobre conidióforos ramificados y constituyen la fase de propagación asexual. Aparecen en los cultivos entre los 2 y 4 días de crecimiento. Cuando se las coloca en un medio adecuado, germinan en 2 a 5 horas. Son las células que normalmente se usan para inocular cultivos como células fertilizantes masculinas en los cruzamientos sexuales.

Los microconidios son uninucleados y pueden germinar y dar micelio, pero su función primordial es en la fecundación. Su corta viabilidad las hace poco empleadas en investigación.

Neurospora crassa es un hongo heterotálico haploide, donde los dos tipos de cruzamiento se designan A y a.

Aparte de su rol en la reproducción sexual, los alelos del tipo de cruzamiento determinan la incompatibilidad vegetativa. No se han observado mutaciones o eventos de recombinación capaces de convertir un tipo de cruzamiento en el otro. Esto es diferente a lo que ocurre en *Saccharomyces cerevisiae*, en el cual un evento de transposición es capaz de convertir a la levadura en autofértil u homotálica (Strathern *et al*, 1980; Nasmyth *et al*, 1987). Los loci correspondientes a los dos tipos de cruzamiento de *N. crassa* han sido clonados y caracterizados físicamente, y se ha demostrado que fragmentos de los clones que contienen estos genes son capaces de conceder a cepas estériles la capacidad de cruzarse con cepas del tipo de cruzamiento opuesto, y que dichos genes serían los responsables de la incompatibilidad heterocarionta, que implica que si células de tipos de cruzamiento opuesto se fusionan en un medio no adecuado para el cruzamiento, la célula resultante heterocarionte, muere (Glass *et al*, 1988).

Al ser la especie heterotálica, requiere la participación de dos tipos de células compatibles (A y a) en la reproducción sexual, que ocurre cuando las condiciones ambientales son desfavorables para el desarrollo vegetativo, por ejemplo, cuando se usa nitrato como única fuente de nitrógeno (Westergaard y Mitchell, 1947).

La fertilización implica la distribución de conidias sobre la superficie del cultivo compatible que contenga protoperitecios.

Una vez que el núcleo masculino fue conducido hasta el interior del ascogonio, donde se encuentra el núcleo femenino, los núcleos parentales sufren varias divisiones mi-

tóticas y, simultáneamente, el ascogonio produce prolongaciones adonde migran los pares de núcleos compatibles. Estas constituyen las llamadas hifas ascógenas que se desarrollan hasta convertirse en las células madres de los ascos. Allí ocurre la fusión de los núcleos dando por resultado un núcleo diploide que enseguida sufre una división meiótica seguida por una mitótica.

El resultado final es un asco con ocho ascosporas que, a su vez, son binucleadas. Las ascosporas son expulsadas al exterior a través del cuello del peritecio. Pueden germinar en un medio adecuado sólo si son previamente sometidas a un shock térmico a 60°C (Figura 1).

Esto determina el nicho ecológico de *Neurospora crassa*, que generalmente se vuelve dominante en los ambientes naturales después de incendios forestales y erupciones volcánicas (Perkins *et al*, 1976).

3.1.2. Organización genética

Neurospora crassa posee un genoma haploide pequeño de apenas 27000 kpb de DNA organizado en 7 cromosomas (Krumlauf y Marzluf, 1980), tamaño apenas 7 veces mayor al genoma de *Escherichia coli*, por lo que se presenta como un modelo muy interesante y sencillo para el estudio de la regulación de la expresión genética en organismos eucarióticos.

A pesar de su sencillez, el genoma de *Neurospora crassa* comparte muchas de las características de los genomas de eucariotes superiores.

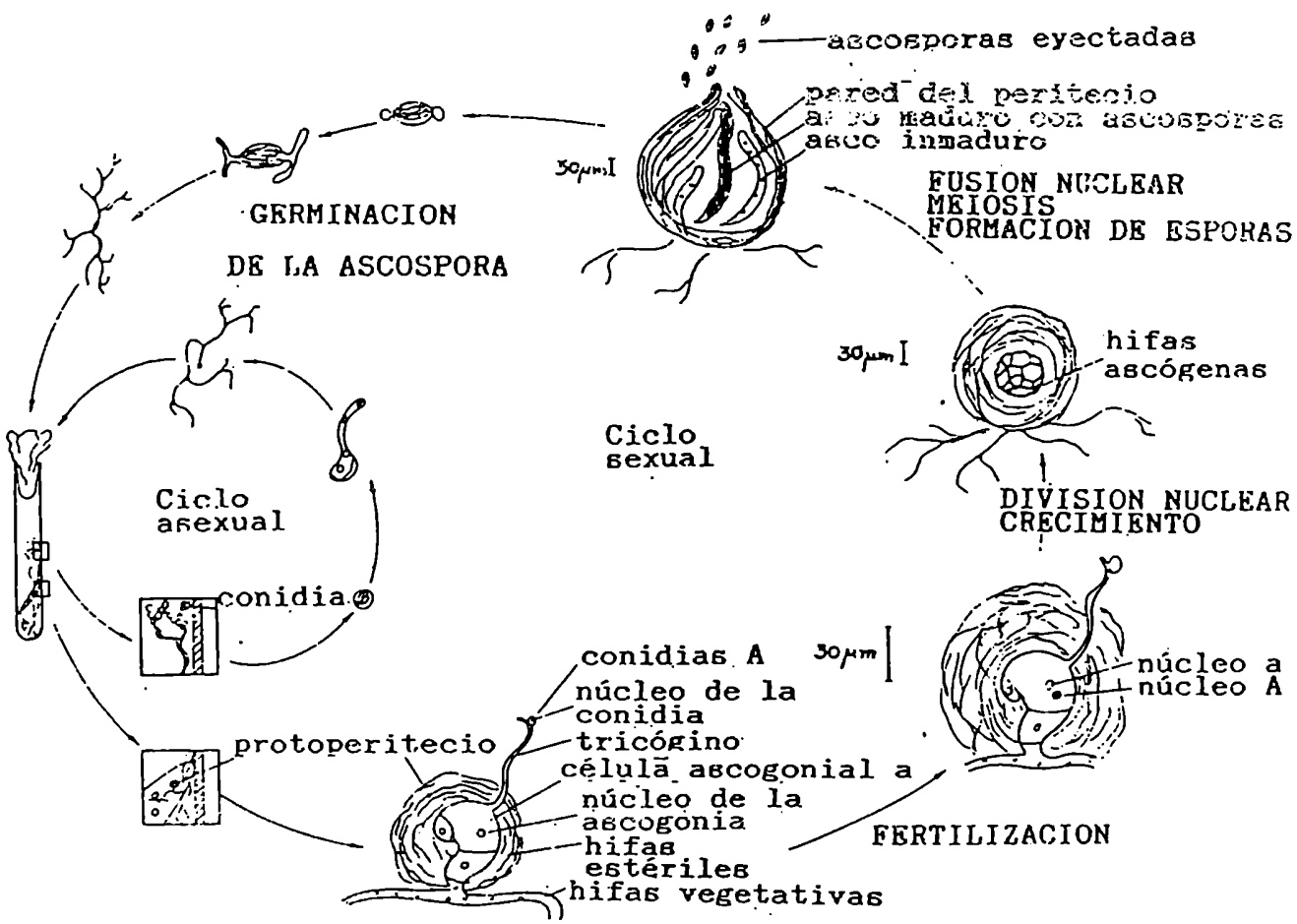


Figura 1: Ciclo de vida de *Neurospora crassa*

Tomado de Davis y de Serres, 1970.

El 90% del DNA de *N. crassa* corresponde a secuencias que se encuentran como copias únicas, el 8% corresponde a secuencias repetitivas, y el restante 2% corresponde a secuencias palindrómicas de muy alta velocidad de renaturalización. Las secuencias repetitivas tienen una complejidad de sólo 15300 pares de bases, con aproximadamente 140 copias por genoma, lo cual sugirió que serían principalmente las secuencias codificantes para los RNA ribosomales.

Efectivamente, las largas unidades repetidas que contienen las secuencias codificantes para 17S; 5,8S y 26S y las regiones espaciadoras se encuentran en 185 copias por genoma y comprenden un 7% del DNA nuclear total y el 90% del DNA repetitivo. Existen evidencias que indicarían que los rDNA se encuentran formando tandems y que muy posiblemente estén todos en un mismo cromosoma.

Las secuencias palindrómicas, por el contrario, estarían dispersas por todo el genoma y tendrían un tamaño de aproximadamente 700 pb, encontrándose aproximadamente 350 copias por genoma.

Asimismo, se ha encontrado que en células vegetativas en rápido crecimiento, habría unos 2000 RNA mensajeros que se podrían agrupar en tres grupos según su abundancia (Krumlauf y Marzluf, 1980).

Aquellos genes nucleares de *Neurospora crassa* que codifican para proteínas y que han sido caracterizados hasta el momento muestran un número menor de intrones de lo que es habitual para eucariotes superiores, aunque no se cumpliría la hipótesis original que fuesen pocos los genes de *N. crassa* poseedores de estas secuencias intercaladas.

Algunos de los genes de *N. crassa* caracterizados y secuenciados hasta ahora, son el correspondiente a la proteína ribosomal L29 (Kreader y Heckman, 1987), un gen induci-

ble durante la conidiación (Roberts *et al*, 1988), el gen de la lacasa (Germann *et al*, 1988), el de la β-tubulina (Orbach *et al*, 1986), el de la metalotioneína (Munger *et al*, 1985), el de la ubiquitina (Taccioli *et al*, 1988), histonas H3 y H4 (Woudt *et al*, 1983), la glutamato deshidrogenasa (Kinnaird y Fincham, 1983), entre otros.

La mayor parte de estos genes posee intrones, que varían en número y tamaño, aunque no superan 500 nucleótidos de longitud los hasta ahora descriptos.

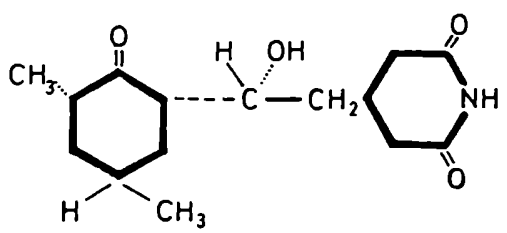
Las secuencias consenso de *splicing* son similares a las observadas para los genes de levadura y otros eucariotes. También comparte con *Saccharomyces* el hecho de que los intrones se acumulan preferencialmente en el extremo 5´ de los genes, siendo sin embargo esta tendencia menos acentuada en *N. crassa*.

Existe un gran número de mutantes a nivel de prácticamente todos los caminos metabólicos estudiados en *N. crassa* (Neurospora Newsletter, 1980).

3.2. DISTINTAS CONDICIONES ADVERSAS CAPACES DE INDUCIR UNA RESPUESTA ADAPTATIVA

3.2.1. Cicloheximida y otros inhibidores de la síntesis proteica

La cicloheximida (actidiona, naramicina A) fue aislada por primera vez de filtrado de cultivos de *Streptomyces griseus* por Leach (Leach *et al*, 1947) y la estructura química fue determinada por Kornfeld (Kornfeld *et al*, 1949). Su fórmula es la siguiente:



Es tóxica para un gran espectro de organismos incluyendo hongos, plantas superiores, mamíferos (Whiffen, 1948, 1950), algas y protozoos (Palmer y Maloney, 1955; Loefer y Matney, 1952). Sin embargo, no tiene efecto alguno sobre organismos procarióticos ni ribosomas mitocondriales o de cloroplasto.

La acción de la cicloheximida sobre las células eucarióticas se basa en la capacidad de la misma de unirse a la subunidad 60S de los ribosomas, inhibiendo la actividad de peptidiltransferasa e impidiendo, por lo tanto, el desplazamiento de los ribosomas sobre el RNA mensajero.

Buena parte de los efectos que se observan al tratar distintos organismos con cicloheximida pueden atribuirse al efecto directo que tiene la cicloheximida sobre la síntesis proteica (Sisler y Siegel, 1967).

Se ha descripto un aumento del 100% específico y transitorio en la transcripción *in vivo* de RNA mensajeros y de RNA de transferencia de rata, 30 minutos luego de aplicar una dosis de cicloheximida capaz de inhibir en 97% la síntesis proteica (Lindell y Duffy, 1979).

En esas condiciones, disminuye la síntesis y el procesamiento de los RNA ribosomales, aunque esta disminución puede explicarse por la ausencia de ciertas proteínas específicas, entre las que se incluyen algunas proteínas ribosomales necesarias para la regulación de la síntesis y el procesamiento del RNA ribosomal precursor (Lampert y Feigelson, 1974).

La inhibición de la síntesis de RNA ribosomal también fue observada en *Achlya ambisexualis* (Timberlake y Griffin, 1974), donde también se observó una inhibición de la síntesis de DNA (Sullia y Griffin, 1977) independiente de la inhibición de la síntesis de proteínas.

Se ha demostrado que la cicloheximida inhibe la disociación GTP-dependiente de polisomas que normalmente acompaña la síntesis proteica (Wettstein *et al*, 1964). Esto está muy posiblemente relacionado con el aumento de 2 a 6 veces en la acumulación de ciertos RNA mensajeros que se observa cuando se inhibe la síntesis de proteínas con cicloheximida, lo cual fue atribuído a un aumento en sus vidas medias (Ernest *et al*, 1978; Kelly *et al*, 1987).

Este efecto sería contrario al observado al tratar con puromicina, antibiótico que por su estructura se asemeja a un aminoacil-tRNA y que tiene el efecto de producir una

liberación acelerada de ribosomas de los polisomas preexistentes.

Asimismo, se sabe que si bien la cicloheximida es capaz de inhibir la síntesis proteica tanto *in vivo* como *in vitro*, esta última sería menos sensible que la síntesis *in vivo* (Siegel y Sisler, 1965; Siegel *et al*, 1966).

La cicloheximida produciría una disminución brusca de la velocidad de síntesis protèica, efecto que no sería comparable al obtenido por tratamiento con calor (*heat shock*), puromicina o análogos de aminoácidos, los cuales provocarían la acumulación de proteínas anormales en el citoplasma celular.

Desde este punto de vista, el efecto primario de la cicloheximida se encuentra muy poco estudiado. Uno de los pocos efectos descriptos hasta el momento, lo constituye la capacidad de la cicloheximida de producir la fosforilación de la proteína S6 ribosomal cuando se inyecta en ratas (Krieg *et al*, 1988). Este efecto sería, sorprendentemente, también observado cuando se produce la activación del crecimiento celular, por tratamiento con distintos agentes mitogénicos.

Dichos ribosomas fosforilados tendrían ventajas en el proceso de iniciación de la síntesis proteica sobre aquéllos sin fosforilar (Duncan y Mc.Conkey, 1982; Burkhard y Traugh, 1984).

Han sido reportadas mutaciones en varios organismos que alteran la sensibilidad de los ribosomas, habiendo sido clonados los genes correspondientes a las proteínas responsables de la resistencia (proteína ribosomal L29) en *S. cerevisiae* (Kaufer *et al*, 1983), en *N. crassa* (Kreader y Heckman, 1987) y en otros eucariotes (Sutton *et al*, 1978).

La levadura *Kluyveromyces fragilis*, cepa salvaje, ha resultado ser resistente a la cicloheximida y sus ribosomas serían insensibles a este antibiótico *in vitro* (Adouette-Panvier y Davies, 1984).

Asimismo, se ha informado de la inducción de tolerancia a la cicloheximida en una serie de organismos: en *Candida maltosa*, la presencia de cicloheximida produce una inhibición casi completa del crecimiento, pero luego ocurre una recuperación que permite la división celular a una velocidad equivalente a la del cultivo en ausencia del antibiótico. Los ribosomas de estas células ya "adaptadas" a la cicloheximida resultaron ser insensibles a la misma en experimentos de traducción *in vitro* usando RNA mensajeros heterólogos, pero dicha tolerancia desaparece cuando las células "adaptadas" fueron incubadas una horas en medio sin antibiótico (Takagi *et al*, 1985).

Un fenómeno similar fue observado en *Neurospora crassa* (Grotewold *et al*, 1988b) y *Sclerotium rolfsii* (Sullia y Maria, 1985). Estos experimentos sugieren la existencia de algún factor inducible por cicloheximida capaz de producir una alteración reversible y no heredable de los ribosomas que tiene como efecto restaurar la velocidad de la síntesis proteica a niveles cercanos a los normales, incluso en presencia del inhibidor. Sin embargo, en el caso de *Sclerotium rolfsii* podría estar también involucrado un fenómeno de conversión de la cicloheximida a especies químicas menos tóxicas (Sullia y Maria, 1985).

En *N. crassa* (cepa salvaje), se ha determinado que concentraciones de cicloheximida de 0,1 µg/ml (0,4 µM) producen ya una inhibición detectable del crecimiento, y que concentraciones de 0,5 µg/ml (2 µM) producen una inhibición superior al 75% en la velocidad de crecimiento.

Concentraciones superiores a 15 µM inhiben la síntesis proteica en un valor mayor al 95%.

Asimismo, se ha descripto que luego de una exposición a cicloheximida 2 a 3 µM se produce una hinchazón y ramificación anormal de los extremos de las hifas y que la regeneración de células perforadas con una aguja capilar es completamente inhibida por la presencia de cicloheximida 3,5 µM (Wilson y Bates, 1969; Hsu, 1963).

La capacidad de la cicloheximida de inducir ciertas actividades enzimáticas en *Neurospora crassa* es un fenómeno que se conoce desde hace al menos 25 años.

Algunas de estas enzimas estarían relacionadas con el metabolismo degradativo y/o con la diferenciación sexual, siendo esta última una respuesta general de muchos hongos sometidos a condiciones ambientales adversas.

La enzima mejor estudiada en este sentido en *N. crassa* es la tirosinasa, responsable de la catálisis de uno de los primeros pasos en el camino biosintético de la melanina, compuesto que da el característico color marrón a los peritecios y ascosporas (Hirsch, 1954).

La tirosinasa es indetectable en cultivos en fase logarítmica o estacionaria crecidos en medio mínimo, pero se puede lograr un aumento considerable de la actividad cuando se inhibe la síntesis proteica, ya sea con actinomicina D, puromicina o cicloheximida (Horowitz *et al*, 1970b). La máxima actividad de tirosinasa lograda por inhibición de la síntesis proteica fue obtenida con cicloheximida en una concentración de 2 µM final y luego de 60 a 72 horas de agregado el inhibidor a cultivos de *N. crassa* en fase logarítmica tardía.

La inducción de la tirosinasa puede lograrse también cuando se somete al cultivo a ayuno de nutrientes (Horowitz y Shen, 1952; Horowitz *et al*, 1961), por inducción sexual

por agregado de macroconidias del tipo de cruzamiento opuesto (Cruz y Terenzi, 1981) o por el agregado de análogos de aminoácidos (Horowitz *et al*, 1970a).

Por todo esto, se ha sugerido la existencia de un represor de alto recambio que regularía en forma negativa todas estas proteínas inducibles por inhibidores de la síntesis proteica (Horowitz *et al*, 1970b).

Asimismo, se han obtenido mutantes estériles femeninas en las cuales no es posible inducir la tirosinasa por ayuno de nutrientes (Horowitz *et al*, 1960).

Se ha demostrado que la inducción se debe a la síntesis *de novo* de la enzima (Katan *et al*, 1975).

Otra enzima que también es capaz de ser inducida por cicloheximida, pero que en este caso se acumula en el medio extracelular, es la lacasa, que al igual que la tirosinasa es una fenol-oxidasa. Esta enzima sería inducible por concentraciones bajas de cicloheximida (Fröehner y Eriksson, 1974) y la máxima actividad de la misma en el medio extracelular, al tratar micelios en fase estacionaria con 2 µM cicloheximida, se detectó 72 horas luego del agregado del inhibidor (Grotewold *et al*, 1988a).

La L-aminoácido oxidasa es una enzima que está involucrada en el catabolismo de aminoácidos y su síntesis se induce con bajas concentraciones de inhibidores de la síntesis proteica (Horowitz, 1965), por carencia de nutrientes o por entrada al ciclo sexual (Prade y Terenzi, 1985).

La actividad de NAD^+ quinasa de *Neurospora crassa*, enzima que cataliza la formación de $NADP^+$ a partir de NAD^+ y que por lo tanto, juega un rol fundamental en la coordinación de los procesos catabólicos y en reacciones de biosíntesis, sería inducible por cicloheximida, shock hipotónico, etanol o por tratamiento con Tritón X-100 0,1%. La concen-

tración de cicloheximida utilizada sería suficiente para inhibir el 100% la síntesis de la proteína, por lo que los autores sugieren una activación enzimática en vez de una inducción *de novo* (Afanasieva *et al*, 1984).

Recientemente, hemos descripto la inducción de varios RNA mensajeros que aparecerían luego del tratamiento de micelios de *N. crassa* en fase estacionaria con 2 µM cicloheximida por 24 a 48 horas. Estos RNA mensajeros se encontrarían totalmente ausentes antes del tratamiento con el inhibidor. Asimismo, se demostró que la población de RNA mensajeros sufre un cambio significativo por el tratamiento con cicloheximida (Aisemberg *et al*, 1987).

Uno de los RNA mensajeros que se acumulan luego del tratamiento fue caracterizado más en profundidad y no codificaría para ninguna de las enzimas hasta ahora descriptas como inducibles por el antibiótico. Se trata de un polipéptido de 70 kD cuya expresión es máxima a las 48 horas luego del tratamiento (Aisemberg *et al*, 1988).

En nuestro laboratorio hemos encontrado asimismo, la acumulación del RNA mensajero que codifica para ubiquitina en cultivos con 48 horas de tratamiento con 2 µM cicloheximida (Taccioli *et al*, 1988).

La ubiquitina es un polipéptido de 76 aminoácidos cuya conjugación a proteínas intracelulares media la degradación selectiva de las mismas en organismos eucarióticos por vía no-lisosomal. Además, estaría relacionada con fenómenos de regulación de la transcripción por unión a las histonas H2A y H2B (Finley y Varshavsky, 1985), a través de la cromatinización del DNA, como del recambio de estas proteínas a través del ciclo celular.

3.2.2. Shock térmico y otros tipos de stress relacionados

Posiblemente la situación de stress más estudiada hasta el momento sea la producida cuando se somete un organismo a un "shock" térmico (*heat shock*). Generalmente, la respuesta a *heat shock* se obtiene cuando la temperatura se eleva unos 5 a 15°C por encima de la temperatura óptima de crecimiento del organismo.

La respuesta del mismo se manifiesta en una inducción casi inmediata de RNA mensajeros que codifican para las hsp (proteínas de *heat shock*)(Lindquist, 1980; Schlesinger *et al*, 1982; Borbeley *et al*, 1985; Yamamori *et al*, 1978; Pelham, 1986). Siendo dicha inducción de 10 a 1000 veces superior al nivel observado en los controles sin tratamiento.

Se ha encontrado que todos los genes que codifican para hsp analizados hasta el momento en organismos eucarióticos, poseen secuencias consenso en sus regiones 5´ flanqueantes que estarían involucrados en la inducibilidad de los RNA mensajeros por calor. Se ha caracterizado el factor activador de la transcripción que se uniría a esta secuencia consenso (Pelham y Bienz, 1982; Wu, 1985) y la interacción del factor con la región regulatoria ocurriría incluso en sistemas heterólogos.

Si bien se ha sugerido que la traducibilidad de los RNA mensajeros correspondientes a las hsp dependía de las condiciones de shock térmico (de Benedetti, 1986), ha sido demostrado que el RNA mensajero correspondiente a la hsp 70 (una de las proteínas mayoritarias y más conservadas de la respuesta al shock térmico) podría traducirse de igual manera aún en ausencia de *heat shock* y que el efecto principal del shock térmico es suprimir la traducción de los RNA mensajeros que no están relacionados con dicha respuesta (Theodorakis y Morimoto, 1987).

Los RNA mensajeros de *heat shock* tendrían una secuencia en el extremo 5´ que aparentemente sería imprescindible para que la traducción de los mismos pueda ocurrir.

También han sido descriptos otros eventos postranscripcionales que ocurren luego del tratamiento térmico. Entre ellos, los principales son un bloqueo en el procesamiento de precursores de RNA mensajeros (Yost y Lindquist, 1986) y un aumento considerable de la estabilidad de los RNA mensajeros correspondientes a las hsp durante el *heat shock*.

Mientras que el shock térmico continúa, en la mayoría de los organismos estudiados las hsp constituyen los productos mayoritarios de traducción, pero una vez que se vuelve a las condiciones normales de temperatura, se restaura el patrón original de síntesis proteica (Banerji *et al*, 1986).

Uno de los fenómenos más interesantes asociados con la respuesta al shock térmico lo constituye la inducción de termotolerancia. Un tratamiento térmico suave es capaz de conferir tolerancia a una temperatura normalmente letal. Esto se ha observado en todos los organismos estudiados hasta el momento (Para una descripción detallada de estos efectos ver, por ejemplo, Schlesinger *et al*, 1982).

Una respuesta similar a la que provoca *heat shock* puede lograrse por una serie de otros tratamientos que en casi todos los casos tienen en común la acumulación de proteínas desnaturalizadas o dañadas, en el citoplasma celular (ver más adelante), habiéndose sugerido que la presencia de estas proteínas anormales *per se*, sería la señal que dispara esta respuesta (Munro y Pelham, 1985; Goff y Goldberg, 1985; Finley *et al*, 1984).

Las hsp 70 constituyen una familia de proteínas cuyos roles fisiológicos han estado en discusión largo tiempo. Se les ha atribuído una función en la disociación del reves-

timiento de clatrina de las vesículas revestidas en forma ATP-dependiente (Pelham, 1986), en la recuperación de la estructura nucleolar luego del daño causado por el *heat shock*, en la unión reversible mediada por ATP a muchas proteínas anormales o incompletamente ensambladas en el retículo endoplasmático, etc.

En base a todos estos efectos, Pelham sugiere como modelo general que la hsp 70 se une a regiones hidrofóbicas de proteínas, ya sea expuestas naturalmente o como producto de la desnaturalización, y que la unión puede ser revertida por la hidrólisis de ATP (Pelham, 1988).

Ha sido sugerido asimismo, que la ubiquitina podría estar involucrada en la señal que inicia la respuesta a *heat shock* (Munro y Pelham, 1985).

Las proteínas inducibles por shock térmico se encuentran muy conservadas en la escala biológica desde bacterias hasta mamíferos, siendo las dos más conservadas la hsp 70 y la hsp 83 (Hunt y Morimoto, 1983).

La hsp 83 de *Drosophila* y levadura, que corresponde a la hsp 90 de vertebrados, se expresa a un nivel basal bastante alto en condiciones normales y se ha demostrado que es capaz de asociarse en forma transitoria con proteína-quinasas de tirosina que se encuentran en tránsito hacia la membrana plasmática. Asimismo, se ha observado que se asocia con los receptores de hormonas esteroides cuando no están unidos a las hormonas (Courteidge y Bishop, 1982; Castelli *et al*, 1986).

Como ya se ha mencionado, son varios los tratamientos capaces de inducir las hsp y éstos incluyen el etanol, el arsenito de sodio, los metales pesados, algunos virus, la síntesis de proteínas anormales por incorporación de análogos de aminoácidos, proteínas extrañas, mutadas o truncadas,

etc. La privación de glucosa, si bien no induce directamente las hsp, sí lo hace con las llamadas grp (*glucose regulated proteins*), entre las que se destaca la grp 78 que pertenece a la familia multigenética de las hsp 70 (Munro y Pelham, 1986), y las grp 94 que es homóloga a la hsp 90 de mamíferos o a la hsp 83 de *Drosophila* (Sorger y Pelham, 1987).

Aparentemente ambas serían proteínas del lumen del retículo endoplasmático y, dado que la privación de glucosa inhibe la N-glicosilación, dando lugar a la acumulación de agregados insolubles de proteínas no glicosiladas, se ha propuesto que las grp ejercerían en el lumen del retículo, funciones similares de renaturalización y solubilización a las descriptas para las hsp (Pelham, 1986).

En *Neurospora crassa*, la respuesta al *heat shock* sería similar a la descripta en otros organismos, aunque el estudio se limita a la inducción de las proteínas y el análisis de RNA mensajeros totales, ya que los genes aún no han sido clonados (Kapoor y Lewis, 1987; Curle y Kapoor, 1987).

La síntesis de las hsp sería ya evidente a los 5 minutos de comenzado el tratamiento. La respuesta no sería del tipo "todo o nada" y a temperaturas intermedias entre normal (30°C) y de *heat shock* (45°C), *N. crassa* sintetiza niveles intermedios de las hsp y la síntesis proteica normal sólo estaría parcialmente suprimida (Plesofsky-Vig y Brambl, 1985; Kapoor, 1983).

Sin embargo, la respuesta en *N. crassa* y en hongos en general, se diferencia por el hecho de que es capaz de reasumir el patrón normal de proteínas por una exposición continuada a temperaturas supraóptimas. Se propuso que esta respuesta transitoria podría estar relacionada con el modo de respiración celular (Plesofsky-Vig y Brambl, 1985).

Además de las hsp principales y muy conservadas, se ha encontrado en *N. crassa* y otros hongos una proteína de respuesta a shock térmico de 96-99 kD que también habría sido descripta en plantas verdes, una hsp 105 (Kapoor, 1983; Kapoor y Lewis, 1987) y tres proteínas de bajo peso molecular que se acumularían en mitocondrias, lo cual ha permitido suponer que la mitocondria podría ser el lugar de origen de la señal intracelular para la respuesta, o un sitio posible para la acción de las proteínas de *heat shock*, dado que muchos inhibidores de la respiración serían capaces de generar una respuesta equivalente (Plesofsky-Vig y Brambl, 1985).

Se ha descripto también que conidias de *N. crassa* almacenarían los mRNA que codifican para tres proteínas de *heat shock* de alto peso molecular, pero sin embargo, las proteínas no se encontrarían presentes en estas células. Dichos RNA mensajeros serían capaces de traducirse durante la primera hora de incubación a alta temperatura, antes que en las conidias tuviera lugar una transcripción activa (Plesofsky-Vig y Brambl, 1985).

En cuanto a la ubiquitina, una proteína que hasta el momento fue considerada una hsp y demostró poseer la región consenso de Pelham necesaria para una transcripción a altas temperaturas en levadura y pollo (Finley y Varshavsky, 1985; Bond y Schlesinger, 1986) no sería inducible en *N. crassa* por *heat shock* (Taccioli *et al*, 1988a) y el gen no poseería la secuencia consenso típica en el extremo 5´ (G.E.Taccioli, comunicación personal, Taccioli *et al*, 1988b).

Asimismo, la proteína de 70 kD inducible por 24-48 horas de tratamiento con 2 µM cicloheximida (Aisemberg *et al*, 1988), tampoco sería inducible por *heat shock*, lo cual plantea la hipótesis de que las proteínas inducibles por cicloheximida en *N. crassa* constituyan un nuevo grupo de proteínas inducibles por stress.

3.2.3. Ayuno o deprivación de determinados metabolitos

Uno de los fenómenos que mejor caracteriza a los seres vivos es la capacidad de los mismos de adaptarse a los cambios en las condiciones ambientales. Este fenómeno, conocido como homeostasis, se manifiesta de diversas maneras. En las secciones anteriores hemos analizado la inhibición de la síntesis de proteínas por bloqueo de la maquinaria biosintética (3.2.1) o el efecto del shock térmico sobre distintos organismos (3.2.2).

En esta sección nos referiremos a la falta de ciertos nutrientes, ya sean esenciales o no, a través de una gran variedad de caminos metabólicos que sólo se activan en caso de necesidad.

Esta capacidad de producir rápidos cambios para la utilización de determinados nutrientes es principalmente evidente en procariotes y eucariotes inferiores, donde la rápida y constante diseminación de estos organismos a medio ambientes distintos y no necesariamente óptimos, las hace imprescindible para garantizar la supervivencia y la reproducción de los mismos.

Muchos de estos organismos poseen formas de resistencia capaces de mantenerse en latencia por mucho tiempo en espera de condiciones ambientales más favorables.

Uno de los sistemas mejor estudiados en hongos respecto a dicha capacidad de utilizar distintas vías para metabolizar un nutriente determinado, es el ejemplo de la regulación del metabolismo del nitrógeno, que constituye el elemento mayoritario que se encuentra en casi todas las macromoléculas complejas de la célula. Los compuestos nitroge-

nados preferidos para la obtención de nitrógeno son glutamina, amonio y glutamato, siendo sin embargo muchos hongos capaces de usar diversas fuentes secundarias de nitrógeno, tales como nitrato, nitrito, purinas, proteínas, muchos aminoácidos, acetamida, acrilamida, etc.

La ausencia de los metabolitos preferidos y, en muchos casos, la presencia de un metabolito secundario, son las señales reconocidas por el organismo para que se produzca la síntesis o la activación de las enzimas involucradas en el catabolismo de dicho metabolito secundario. En este sentido, grandes avances se han logrado en el estudio de la regulación del metabolismo del nitrógeno en *N. crassa*, *Aspergillus nidulans* y *Saccharomyces cerevisiae* (Marzluf, 1981).

Así es que se ha caracterizado el gen regulatorio nit-2 de *N. crassa* como el responsable de la regulación de otros genes regulatorios menores cuando el nitrógeno es limitante. Ante la falta de una fuente de nitrógeno fácilmente asimilable, el producto de este gen es capaz de iniciar la transcripción de los genes de nitrato- y nitrito-reductasas, las enzimas del metabolismo de purinas, deaminasas, proteasas extracelulares y, muy posiblemente, todas las otras enzimas involucradas en la obtención de nitrógeno de alguna otra fuente (Tomsett y Garrett, 1981; Reinert y Marzluf, 1975; Sikora y Marzluf, 1982; Cohen *et al*, 1975). Cuando *N. crassa* se encuentra en presencia de amonio, glutamina o ácido glutámico, se produce una represión catabólica de todas estas vías metabólicas.

También se han descripto en *N. crassa* la inducción por ácido úrico de una uricasa, enzima capaz de convertir ácido úrico en peróxido de hidrógeno y alantoína que luego de varios pasos metabólicos darían amonio. La enzima, de un pe-

so molecular de 33 kD, es peroxisomal y su inducción es *de novo* en presencia de ácido úrico y ausencia de los metabolitos capaces de producir represión catabólica. Se habría verificado inducción enzimática luego de apenas 2 horas de agregado el inductor (Nahm y Marzluf, 1987).

También se observó la inducción por determinados aminoácidos de una deaminasa extracelular luego de 24 horas del agregado de los mismos, inducción también sensible a los mismos represores (De Busk y Ogilvie, 1984); así como la inducción de proteasas y RNAasas (ver más adelante).

Neurospora crassa posee un sistema de control de azufre muy similar al de nitrógeno. Por falta de azufre, el organismo derreprime una serie de enzimas y sistemas de transporte involucrados en el catabolismo de azufre. Esta derrepresión está regulada por un gen regulador positivo, cys-3, que tendría una función análoga al locus nit-2 (Metzenberg, 1979).

Ha sido descripta la existencia de algunas enzimas involucradas en el catabolismo de distintos compuestos, que serían reguladas a través de más de un camino metabólico, dependiendo de las condiciones.

Así es que se ha descripto la inducción de la RNAasa N_4 de *N. crassa* por ayuno en cualquiera de los tres nutrientes esenciales que puede proveer la hidrólisis del RNA, es decir, N, C y P. Esta enzima es extracelular y no se requiere de la presencia de RNA para que la inducción de la misma ocurra (Lindberg y Drucker, 1984). Ya había sido descripta previamente una nucleasa N_4 de *Cándida* (Lindberg *et al*, 1981), de *Mucor* (Hasunuma y Ishikawa, 1977) y de *Aspergillus* (Cohen *et al*, 1975), siendo muy similares en estas especies las formas de regulación de estas enzimas.

También se ha descripto la inducción de una RNAsa N1 en cultivos estacionarios de *N. crassa* o por ayuno en fosfato (Hasunuma *et al*, 1976).

Se ha descripto asimismo, la inducción de proteasas extracelulares por ayuno de N, C o S y la presencia de proteínas en el medio extracelular como única fuente de estos nutrientes (Cohen y Drucker, 1977). En estos casos, la señal inductora no sería dada por estos compuestos, incapaces de entrar, sino que probablemente el ayuno sería lo que dispararía dicha inducción.

Una L-aminoácido oxidasa intracelular ha sido descripta como inducible luego de 48 horas de pasaje de micelios de *N. crassa* a buffer fosfato, lo que implicaría un ayuno tanto en N como en C y S. En estas idénticas condiciones, se habría verificado inducción de tirosinasa, por lo que se planteó un mecanismo común de inducción para ambas enzimas (Prade y Terenzi, 1985). En este caso no habría posibilidades de que fuera un metabolito el que las induce, sino en todo caso seguramente, la ausencia de síntesis proteica inducida por el ayuno, tal como ocurre con cicloheximida (ver sección 3.2.1) o alguna otra señal relacionada con la falta de un nutriente.

Han sido descriptas las inducciones de una serie de otras enzimas degradativas en *N. crassa* y otros organismos.

Así es que se ha encontrado una actividad de fenoloxidasa extracelular, con actividad de lacasa aparentemente no ligada a la melanización de protoperiterios como ocurre con la tirosinasa (intracelular). Esta enzima es inducible en *N. crassa*, ya sea por inhibición de la síntesis proteica por cicloheximida (Fröehner y Eriksson, 1974), o por agregado de diversos fenoles y difenoles al medio de crecimiento

(Bollag y Leonowicz, 1984). Aún no se conoce bien la función de la lacasa, aunque se la ha asociado a la degradación de lignina (Kirk, 1988).

En otros organismos se ha detectado una actividad de peroxidasa asociada a la degradación de lignina (ligninasa) a diferencia de lo que ocurre en *N. crassa*, donde esta enzima no se ha encontrado. En *P. chrysosporium* estas enzimas también se inducen por ayuno de fuentes de nitrógeno asimilable aún en ausencia de sustratos lignocelulósicos en el medio (Keyser *et al*, 1978).

También hay cepas de *N. crassa* capaces de producir etanol, usando celulosa como fuente de carbono (Rao *et al*, 1982) a través de la inducción de las enzimas apropiadas.

El efecto de los distintos ayunos no es únicamente el de inducción de ciertas actividades enzimáticas. Así es que se ha encontrado que la deprivación de carbono, azufre o nitrógeno produce en *Neurospora crassa* una disminución en los pool internos de purinas, disminuyendo especialmente la relación GTP/ATP por ayunos de nitrógeno y/o azufre (Pall y Robertson, 1988).

Si bien el rol de las poliaminas *in vivo* está poco claro, se sabe que estos compuestos son indispensables en eucariotes, tanto a nivel de replicación del DNA, de transcripción como de traducción (Tabor y Tabor, 1984).

Las poliaminas espermidina y putrescina se encuentran presentes tanto en células eucariotas como procariotas, mientras que la espermina no habría sido encontrada en estas últimas aunque sí en eucariotas.

En la Figura 2 se muestran las vías generales de biosíntesis de poliaminas con las enzimas que catalizan cada paso, habiendo sido descripto que *Neurospora crassa* sólo es

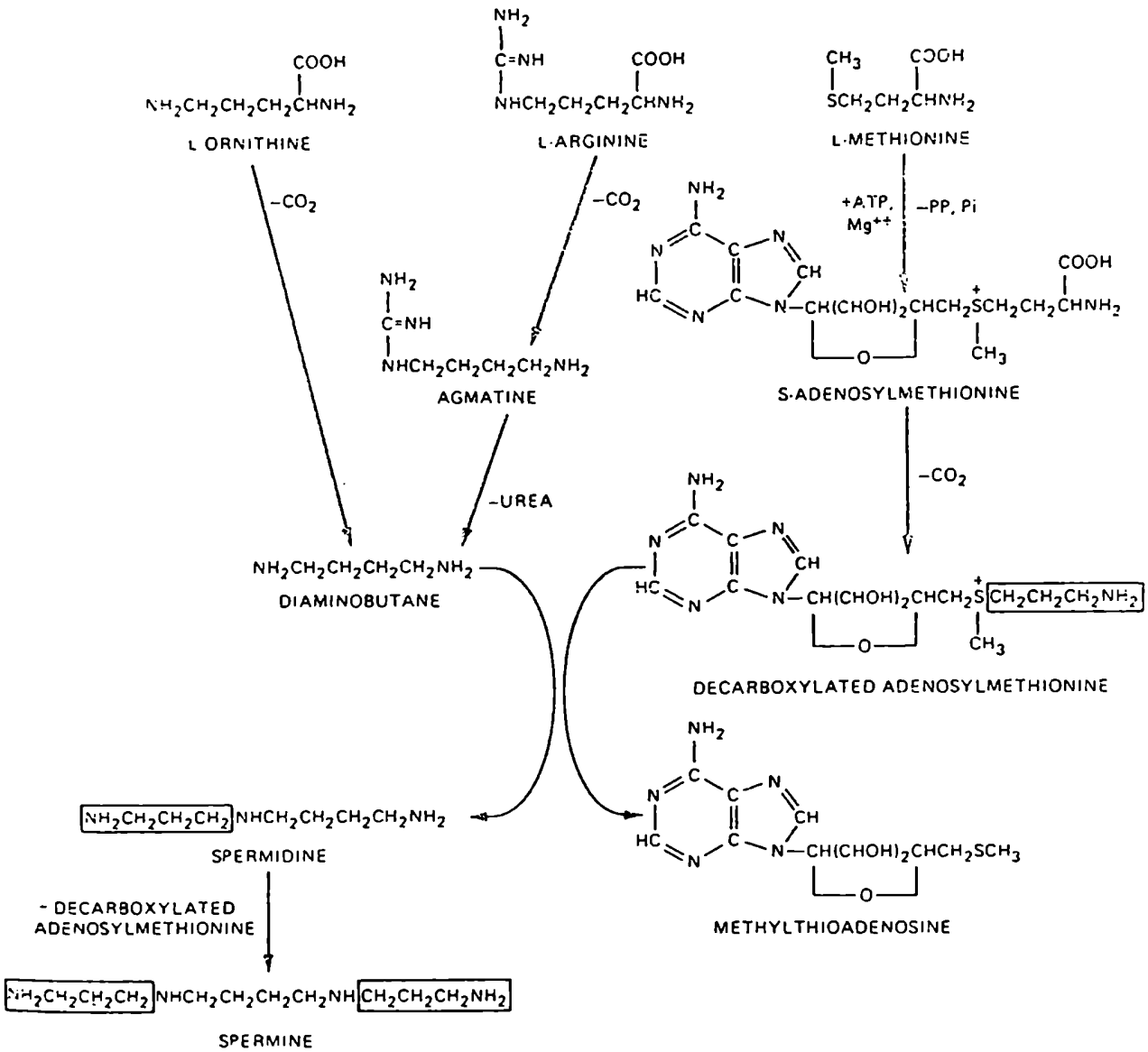


Figura 2: Vías generales de biosíntesis de putrescina, espermidina y espermina

En *Escherichia coli* el paso de espermidina a espermina no estaría presente y esta última no habría sido detectada. En levaduras y células de mamífero, la vía arginina —— agmatina —— diamino-butano (putrescina) no existe. Tomado de Tabor y Tabor, 1984.

capaz de sintetizar putrescina a partir de ornitina a través del paso metabólico catalizado por la ornitina decarboxilasa (Paulus *et al*, 1982).

En líneas de fibroblastos transformados de ratón, así como en otras células eucariotas, se ha demostrado el arresto del crecimiento cuando se reducen marcadamente los niveles intracelulares de poliaminas por tratamiento con el inhibidor "suicida" difluorometilornitina (DFMO) que se une en forma específica e irreversible a la ornitina decarboxilasa (ver Figura 2). El crecimiento puede ser restaurado por adición exógena de poliaminas (Medrano *et al*, 1983). Efectos similares se obtienen en *N. crassa* cuando a cultivos de una cepa deficiente en arginasa se le agrega arginina exógena, que produce una inhibición casi total de la enzima encargada de producir L-ornitina a partir de glutamato, por lo que el crecimiento prosigue pero muy lentamente, debido a una deficiencia en la cantidad de poliaminas. Sin embargo, el agregado de espermidina o putrescina exógena restaura el crecimiento (Davis *et al*, 1985; Eversole *et al*, 1985).

Se han estudiado un gran número de mutantes en las vías biosintéticas de poliaminas, tanto en *Escherichia coli* (Maas, 1972), como en *Saccharomyces cerevisiae* (Whitney y Morris, 1978), *N. crassa* (Davis *et al*, 1985; Eversole *et al*, 1985), y otros.

Se sabe que en *N. crassa* la espermidina regula en forma negativa la síntesis de ornitina decarboxilasa (ODC), mientras que la putrescina promueve la inactivación de dicha enzima (Davis *et al*, 1985).

Por otra parte, puede lograrse resistencia a DFMO por un pretratamiento con concentraciones micromolares de cicloheximida en células de mamífero en cultivo (Medrano *et al*, 1986), y ha sido propuesto por los autores que la ciclo-

heximida podría estar induciendo la expresión de genes que permitirían a las células proliferar con muy bajas concentraciones de putrescina y espermidina, aunque ninguna evidencia ha sido aún presentada en ese sentido.

Todas estas evidencias llevan a demostrar que *Neurospora crassa*, al igual que muchos otros organismos, es capaz de generar una respuesta rápida tendiente a contrarrestar ciertas condiciones adversas del medio ambiente.

Dichas condiciones adversas pueden estar dadas ya sea por ayuno en determinados metabolitos o por ciertas condiciones de stress.

En ambos casos, los sistemas de respuesta parecen ser homólogos en cuanto al tipo de regulación y la rapidez con la cual pueden ser disparados, siendo la característica general, la acumulación de un polipéptido(s) determinado, ausente en las condiciones normales. En los distintos sistemas estudiados hasta el momento, se ha visto predominantemente un control transcripcional, de manera que ante una situación adversa se produce rápidamente un gran aumento en la cantidad de determinados RNA mensajeros que codifican para las proteínas capaces de garantizar la supervivencia en esas condiciones no favorables.

Sin embargo, han sido descriptos casos en que el control se debería a un aumento en la estabilidad de ciertos RNA mensajeros, o a una traducción preferencial, permitiéndose que sólo algunos RNA mensajeros necesarios para esa respuesta se traduzcan mientras que otros prescindibles dejan de hacerlo. Incluso el control puede ejercerse a nivel de la estabilidad de los polipéptidos ya formados, degradándose selectivamente unos frente a otros.

Ha sido descripto asimismo, que la resistencia de muchas células eucarióticas a ciertas sustancias inhibitorias del crecimiento o de la proliferación celular se basan

en que en las mismas se ha seleccionado una población con una dosis génica aumentada correspondiente ya sea a la proteína blanco del inhibidor o a enzimas capaces de destruírlo, a través del fenómeno conocido como amplificación génica (Starck y Wahl, 1984).

Todos estos mecanismos hacen que para el estudio de la regulación de la expresión de proteínas de stress o inducibles por ayuno, haya que tener en cuenta las distintas alternativas regulatorias sin descartar la probabilidad de que varias situaciones de stress diferentes fueran capaces de inducir una respuesta similar en cuanto a la expresión de genes en común, cuyo control podría ejercerse en uno o varios de los niveles mencionados.

3.3. OBJETIVOS DE ESTA TESIS

El objetivo de esta Tesis es encarar el estudio de la respuesta temprana de *Neurospora crassa* a la inhibición parcial de la síntesis proteica.

Ha sido descripto en otras secciones de la Introducción, el efecto producido por muchas situaciones desfavorables en una serie de organismos, junto a las distintas respuestas que dichas condiciones inducen. Si bien gran cantidad de estudios han sido llevados a cabo, tendientes a determinar el tipo de respuesta disparada por el shock térmico, que constituye la situación de stress más estudiada hasta el momento, muy poco es lo que se sabe respecto de los efectos inmediatos producidos por la inhibición de la síntesis proteica.

Neurospora crassa, un eucariote inferior que se presenta como modelo interesante para estos estudios debido a la sencillez de su genoma y a la facilidad de crecimiento, presenta un interés particular debido al hecho de que la inhibición de la síntesis de proteínas es capaz de producir la inducción de la actividad de varias enzimas relacionadas a mecanismos degradativos y a la diferenciación sexual.

Sin embargo, la inducción de estas actividades ocurre luego de 24 horas de comenzado el tratamiento de inhibición parcial de la síntesis proteica. Se ha visto asimismo, que son suficientes sólo 6 horas de tratamiento con cicloheximida para que se desarrolle el fenómeno de tolerancia al inhibidor, por lo que resulta razonable suponer que en ese tiempo ya se han sintetizado los factores necesarios para desencadenar estas respuestas.

Debido a estas razones, se ha decidido encarar el estudio de la respuesta temprana a fenómenos de inhibición de la síntesis proteica en *Neurospora crassa*, a nivel molecular, analizando los genes inducibles por cicloheximida y sus productos de expresión.

Se utilizó la cicloheximida como herramienta para obtener una inhibición parcial de la síntesis proteica en forma reproducible, y se procedió al clonado de algunas de estas secuencias génicas con el fin de establecer si otras condiciones adversas al crecimiento producirían una respuesta similar a nivel de la expresión de estos genes.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. REACTIVOS

agar.....Difco o Merck
agarosa.....BRL
casaminoácidos.....Difco
cicloheximida.....Sigma
compuestos radioactivos....New England Nuclear Corp.
extracto de levadura.....Difco o Merck
ficoll.....Sigma
filtros de nitrocelulosa.....Schleicher & Schüll
IPTG.....Sigma
kit de *nick translation*....New England Nuclear Corp.
kit de *random priming*.....Amersham
kit de secuenciación (Sequenasa).....USB Corp.
kit de traducción *in vitro*.....NEN
marcadores de peso molecular para PAGE-SDS.Pharmacia
membrana de nylon para transferencias de ácidos nucleicos (Gene Screen).....NEN
NZ-amina.....Mumko Sheffield
oligo dT_{12-18}.....Sigma
oligo dT-celulosa.....Sigma
película RX Curix RP1.....Agfa Gevaert
polietilenglicol.....Sigma
polivinilpirrolidona.....Sigma
poly A sintético.....Miles
proteinasa K.....Sigma
puromicina.....Sigma
RNAsin.....Promega Biotec
Sepharosa CL-4B.....Pharmacia
seroalbúmina bovina.....Sigma
triptona.....Difco o Merck
tris.....Sigma
X-gal.....Sigma

La formamida y el formaldehído fueron deionizados con una resina de intercambio iónico mixta (MB3-Amberlite, BioRad) y se guardaron fraccionados y congelados a -20°C hasta su uso. El fenol se purificó por destilación fraccionada, se neutralizó con un volumen de buffer Tris-HCl 1M pH 8,0; 1 volumen de buffer Tris-HCl 0,1M pH 8,0 con 0,2% (P/V) de 2-mercaptoetanol y se guardó a -20°C hasta su uso.

4.2. CONDICIONES DE USO DE ENZIMAS DE RESTRICCION Y MODIFICADORAS

Todas las enzimas de restricción y modificadoras fueron obtenidas de distintas fuentes comerciales y se utilizaron, en los casos en que fue posible, en las condiciones recomendadas por los fabricantes:

buffer 1: AccI, ClaI, NarI, PvuII, RsaI.

buffer 2: AvaI, BclI, BglI, DdeI, HaeIII, HhaI, HindIII, HinfI, PstI, SstI, TaqI, XbaI, XhoI.

buffer 3: BamHI, BglII, EcoRI, NcoI, NsiI, SalI.

buffer 4: HincII, Sau3AI, SmaI.

buffer	Tris-HCl (mM)	pH	$MgCl_2$ (mM)	NaCl (mM)	KCl (mM)	BSA (µg/ml)
1	50	8,0	10	-		100
2	50	8,0	10	50		100
3	50	8,0	10	100	-	100
4	50	8,0	5		50	100

La T4-DNA ligasa se utilizó en buffer Tris-HCl 66 mM, pH 7,6; $MgCl_2$ 6,6 mM, ATP 2 mM, espermidina 1 mM y BSA 0,1 mg/ml, a 24°C por tiempo mayor de 4 horas para extremos romos y durante la noche a 20°C para extremos cohesivos, siempre con 1 unidad de enzima por reacción.

La actividad de fosfatasa alcalina se llevó a cabo en Tris-HCl 50 mM pH 9,0, $MgCl_2$ 1 mM, $Zn(AcO_2)$ 0,1 mM y espermidina 1 mM a 37°C por una hora.

Para destruir una eventual contaminación con DNAsa, se procedió a calentar a 100°C x 10 min toda fracción de RNAasa a utilizar.

4.3. CEPAS Y CONDICIONES DE CULTIVO DE *Neurospora crassa*

4.3.1. Cepas utilizadas

Cepa	A/a	Alelo	FGSC #stock	Característica
St. Lawrence 74A	A			salvaje
cyh-2	A	KH53	4071	resistente a cicloheximida
spe-1	A	TP-138	4268	ODC-

Tabla I: Cepas de *N. crassa* utilizadas

4.3.2. Condiciones de cultivo y mantenimiento de las cepas

Las condiciones de cultivo fueron las siguientes, salvo que se aclare otra cosa: En medio mínimo N de Vogel (Vogel, 1956) con mitad de fuerza iónica y 0,5% de sacarosa, se inocularon 10^5 conidias por ml de cultivo a 30°C en agitador de aire a 200 rpm por 60 horas.

El tratamiento con cicloheximida consistió en el agregado a los mismos del volumen necesario de una solución madre de cicloheximida de 10 mg/ml en agua estéril. Se prosiguió luego la incubación, en las condiciones descriptas por el tiempo indicado en cada caso. Los micelios se cosecharon por filtración, se lavaron con abundante agua deionizada y se guardaron a -70°C hasta su utilización.

En el caso de la cepa StL74, los repiques se mantuvieron en tubos pico de flauta con medio mínimo N de Vogel (Vogel, 1956), con 2% sacarosa y 2% agar. En el caso de la cepa 4268, se utilizó el mismo medio adicionado con 1 mM espermidina. La cepa 4071 fue mantenida en el mismo medio con el agregado de cicloheximida 10 µM con el fin de mantener la presión selectiva sobre la misma.

4.4. CEPAS BACTERIANAS UTILIZADAS Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

Para el plaqueo y amplificación de fago λ, salvaje o recombinante, se utilizó la cepa de *Escherichia coli* K802 (Wood, 1966). Se partió de un cultivo líquido crecido durante una noche en medio NZCYM a 37°C con agitación intensa. El medio NZCYM contiene por litro: 10 g NZ amina (o alternativamente hidrolizado de caseína), 5 g de NaCl, 5 g de extracto de levadura, 1 g de casaminoácidos y 2 g de $MgSO_4.7H_2O$ ajustado a pH 7,5 con NaOH 10 N.

El plaqueo de los fagos sobre medio sólido fue llevado a cabo en cajas de Petri conteniendo 0,16 ml de medio NZCYM por cm^2 suplementado con 1,5% de agar. Se mezcló luego 0,1 ml del cultivo líquido de la cepa K802 con la cantidad adecuada de fagos contenida en 0,1 ml de buffer SM (Tris-HCl 50 mM pH 7,5; NaCl 0,1 M, $MgSO_4$ 10 mM y gelatina 0,01%). Se dejó 30 minutos a 37°C sin agitación, se agregó 0,05 ml de NZCYM suplementado con 0,6% agarosa, por cm^2. Este medio debe utilizarse luego de fundido y enfriado hasta 55°C. Se volcó sobre el medio sólido y se dejó gelificar. Se incubó por al menos 12 horas a 37°C. Se utilizó cajas de 9 cm de diámetro o 15 cm de diámetro, según se indica en cada caso.

La amplificación de los clones recombinantes seleccionados se llevó a cabo en medio NZCYM líquido (Maniatis *et al*, 1978). Se centrifugó 10^{10} células de K802, se las resuspendió en 5 ml de buffer SM y se las mezcló con $5x10^7$ ufp del fago proveniente de resuspender en buffer SM un cultivo confluente en medio sólido previamente titulado. Luego de 30 min a 37°C sin agitación, se agregó la mezcla de bacterias y fagos a 500 ml de medio NZCYM y se incubó por un tiempo superior a las 8 horas a 37°C. La incubación se prolongó luego

hasta que se verificó lisis total en una alícuota del cultivo en un tubo de ensayo por agregado de un par de gotas de cloroformo. Se agregó entonces 2 ml de cloroformo al cultivo, se incubó 30 min más a 37°C con agitación enérgica y se guardó a 4°C. Los títulos de fagos obtenidos de esta manera son de alrededor de 10^9-10^{10} ufp/ml.

Para el trabajo con plásmidos se utilizó la cepa de *E. coli* MC1061 (Baeck *et al*, 1983). Esta cepa se cultivó en medio LB que contiene por litro: 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl, ajustado a pH 7,5 con NaOH 10 N.

Para preparar células competentes capaces de ser transformadas por plásmidos (Mandel e Higa, 1970), se partió de un cultivo de *E. coli* MC1061 crecido en LB a 37°C hasta A_{600}=0,4. Trabajando a partir de aquí en hielo o a 4°C se cosecharon por centrifugación, se resuspendieron suavemente en 10 ml de $CaCl_2$ 30 mM frío y se dejaron 30 min en hielo. Se volvió a centrifugar y resuspender el sedimento en 2 ml de $CaCl_2$ 100 mM, y se dejaron en hielo hasta su utilización dentro de las 24 horas de preparadas.

Para transformar con plásmidos se mezclaron 30 µl de estas bacterias competentes para la transformación preparadas en el día, con 10 µl de DNA plasmídico. Luego de 30 min en hielo, se incubó la mezcla 2 min a 42°C, se agregó 1 ml de medio LB y se dejó recuperar entre 30 y 60 min a 37°C sin agitación. Las bacterias se extendieron con rastrillo de vidrio sobre cajas de Petri con 10 ml de LB con 1,5% agar y 100 µg/ml de ampicilina y se incubó a 37°C toda la noche. Se obtuvo de esta manera, una eficiencia de transformación mayor que 10^6 bacterias resistentes al antibiótico por µg de plásmido. Para preparar plásmido, las bacterias portadoras

fueron crecidas en medio LB con 100 µg/ml de ampicilina, con agitación, por 12 horas en el volumen que se indica en cada caso.

Para transformar con el fago M13 (Messing, 1983), se utilizó la cepa JM101. Un cultivo de JM101 obtenido a partir de una colonia seleccionada en medio mínimo fue crecida durante 10 hs a 37°C en medio LB. La preparación de células competentes para la transformación con la forma replicativa del fago M13 (circular doble cadena), se llevó a cabo inoculando 100 ml de LB con 2 ml del cultivo anterior, y se dejó crecer aproximadamente 90 min a 37°C con agitación muy fuerte. Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 4°C y se resuspendieron suavemente en 50 ml $CaCl_2$ 50 mM frío. Se dejó 40 min en hielo, se volvió a centrifugar a 4°C y se resuspendió el sedimento bacteriano en 5 ml $CaCl_2$ 50 mM frío. Se dejó luego entre 2 y 24 hs en hielo.

La transformación se llevó a cabo por agregado de 10 µl de H_2O conteniendo aproximadamente 10 ng de DNA a 200 µl de células competentes (aproximadamente $5x10^9$ cél/ml) y se dejó 40 min en hielo. Se calentó por 2 min a 42°C (shock térmico) y se volvió a dejar en hielo hasta el momento de plaquear.

El plaqueo se llevó a cabo mezclando en un tubo que contenía 3 ml de LB con 0,6% agarosa fundido y enfriado a 50°C, 200 µl de bacterias (10^8 bact/ml) JM101 provenientes de un cultivo fresco y crecido por 10 horas, la mitad del volumen de transformación, 20 µl de IPTG (10 mg/ml) en H_2O y 40 µl de X-gal 2% en DMF. Se agitó y se volcó sobre una caja de Petri conteniendo 10 ml de LB suplementado con 1,5% de agar. Se incubó por 12 horas a 37°C. Para el cálculo de la eficiencia de transformación se midió el número de placas de retardo de crecimiento azules, y dicho valor osciló alrededor de $5x10^5$ por µg de DNA control agregado.

La obtención de formas simple cadena del fago se realizó a partir de cultivos en 2 ml de LB, al cual se adicionó 15 µl de un cultivo de JM101 fresco crecido por 10 horas y aproximadamente $5x10^7$ unidades formadoras de placas de retardo de crecimiento de fagos, y se incubó por 5 horas a 37°C con fuerte agitación.

4.5. MARCACION *in vivo* CON [^{35}S]MET

4.5.1. Obtención de muestras para el estudio de la velocidad de incorporación de [^{35}S]Met

Se partió de un cultivo de *N. crassa* StL 74A crecido por el tiempo indicado en las condiciones descriptas anteriormente. Del mismo se tomó una alícuota de 200 ml inmediatamente antes del agregado de 2 µM cicloheximida y otras alícuotas a las 1 h, 3 h, 5 h y 10 h después del agregado del inhibidor.

A cada alícuota se le agregó [^{35}S]Met (1134 Ci/mmol) de manera que la concentración final fuera de 0,1 µCi por ml de cultivo. Inmediatamente se tomó la primera alícuota de 30 ml correspondiente al t_0. Cada alícuota se volcó en un volumen 10 veces mayor de agua helada y se filtró rápidamente lavando luego el micelio con abundante agua helada y enseguida se congeló a -70°C hasta su procesamiento. Luego se siguió una curva de tiempo de incorporación a 1 (t_1), 2 (t_2), 4 (t_4) y 10 min (t_{10}) luego del agregado del isótopo radioactivo tanto para 1, 3, 5 y 10 horas luego del agregado de cicloheximida.

4.5.2. Cuantificación de la [^{35}S]Met incorporada

Para cuantificar la incorporación de [^{35}S]Met se procesaron las muestras de la siguiente manera: se homogeneizó el micelio con Dounce en buffer Tris-glicina 200 mM pH 8,8 y fluoruro de fenilmetil sulfonilo (PMSF) 1 mM. Se centrifugó el homogenato 10 minutos a 10.000xg y se extrajo el sobrenadante. A esta fracción soluble se le determinó la in-

corporación de [^{35}S]Met a material TCA insoluble: se depositó la fracción de la muestra a medir en un filtro de fibra de vidrio que se sumergió 10 min en TCA 10% hirviendo, 10 min en TCA 10% frío, 10 min en etanol, 10 min en acetona y luego de secar en estufa a 80°C se contaron con tolueno-Omnifluor como centelleador, utilizando un contador Beckman. La concentración de proteínas fue determinada por el método de Lowry, usando BSA como standard (Lowry *et al*, 1951).

4.5.3. Obtención de muestras para el análisis de polipéptidos marcados por electroforesis en gel de acrilamida-SDS

Se partió de un cultivo de *N. crassa* en las condiciones indicadas en cada caso particular y se extrajo una alícuota de 30 ml en un Erlenmeyer de 50 ml, a la cual se agregó [^{35}S]Met (1134 Ci/mol) hasta una concentración final de 10 µCi por ml de cultivo. Se incubó con agitación fuerte a 30°C por 2 horas y luego de este tiempo se cosechó el cultivo de 30 ml por filtración. Se lavó con abundante agua fría y se guardó a -70°C.

La preparación de la muestra se llevó a cabo homogeneizando con Dounce en buffer Tris 25 mM-glicina 200 mM pH 8,8, PMSF 1 mM. Se centrifugó 10 min a 10.000xg y se tomó el sobrenadante, que se guardó a -20°C hasta su uso.

4.6. ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA CON SDS (PAGE-SDS)

Las proteínas marcadas con [^{35}S]-metionina se separaron en geles planos de poliacrilamida (Laemmli, 1970) de 20x20 cm y 0,35 mm de espesor. El gel separador (15 cm) utilizado se compone de: acrilamida-bisacrilamida (30:1) 12%, buffer Tris-HCl 0,36 M pH 8,8, y SDS 0,1%. El gel concentrador contiene acrilamida-bisacrilamida (30:1) 5%, buffer Tris HCl 0,13 M pH 6,8 y 0,1% SDS. Se usó como buffer de corrida Tris 25 mM-glicina 200 mM pH 8,8 y 0,1% SDS.

Las muestras fueron tratadas con 1 volumen de *cracking buffer* 2x(SDS 2%, 2 mercaptoetanol 2%, Tris 50 mM glicina 400 mM pH 8,8 y azul de bromofenol 0,02%) durante 5 min a 100°C y luego se sembraron. La electroforesis se comenzó a 10 mA hasta que el frente de corrida pasó al gel separador y luego se prosiguió a 30 mA. Salvo que se indique otra cosa, se utilizaron como marcadores de peso molecular: fosforilasa b (94.000), albúmina (67.000), ovoalbúmina (43.000), anhidrasa carbónica (30.000), inhibidor de tripsina (20.100) y α-lactoalbúmina (14.400).

El gel se tiñó a continuación con Coomasie Brillant blue R-250, 0,05%, metanol 40%, TCA 10% recién preparado y filtrado luego de su preparación. La tinción se prolongó por 1 hora y luego se lavó con metanol 45%, ácido acético 10% durante 3-4 horas.

Se prosiguió con un lavado de 30 min en agua y luego se incubó 1 hora en salicilato de sodio 1 M (centelleador) y a continuación se volvió a lavar 30 min en agua. Finalmente, el gel se secó en un secador de geles a 70°C y se autofluorografió a temperatura ambiente sin placa intensificadora por los tiempos indicados en cada caso. En los casos en que

se indique, se llevó a cabo el análisis de los autorradiogramas por densitometría, utilizando un espectrodensitómetro Crudo Caamaño a 600 nm.

4.7. PURIFICACION DE ACIDOS NUCLEICOS

4.7.1. Purificación de DNA de *Neurospora crassa*

La obtención de DNA total (nuclear y mitocondrial) de *N. crassa* se llevó a cabo por una modificación del método de Blin y Stafford (Blin y Stafford, 1976).

El micelio húmedo se molió en un mortero con ayuda de N_2 líquido. El polvo congelado resultante se volcó como fina lluvia sobre una solución de EDTA 0,5 M pH 8,0; Sarcosyl 0,5% y Proteinasa K 100 µg/ml en una proporción de 10 ml/g peso húmedo, y se dejó toda la noche con agitación suave a 37°C.

El homogenato obtenido se extrajo dos veces con PCA, separando cada vez la fase acuosa (superior) de la orgánica por centrifugación a 10.000xg por 10 minutos a temperatura ambiente. La fase acuosa se dializó luego contra 500 volúmenes de H_2O. El ácido nucleico se precipitó luego con 1/10 de volumen de NaAcO 3 M pH 5,2 y 2 volúmenes de etanol. Se enfrió 10 min a -70°C y se centrifugó 10 min a 12.000xg. El precipitado se disolvió en 1/10 del volumen previo a la centrifugación en buffer TE (Tris HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM).

Para eliminar el RNA de la muestra, se agregó RNAasa A en concentración final 100 µg/ml y se incubó 60 min a 37°C. Se agregó 1/10 volumen de NaAcO 3 M pH 5,2 y luego, lentamente y por las paredes del tubo, se agregó 2 volúmenes de etanol previamente enfriado a -70°C y se procedió a enrollar en una varilla de vidrio el DNA que precipitó en la interfase agua-etanol. Luego se lavó el DNA enrollado con una mezcla de etanol-H_2O 70% (V/V) y se dejó secar el material enrollado. Luego se resuspendió en el mínimo volumen de buffer TE y se guardó a -20°C hasta su uso.

El rendimiento es de unos 100 µg de DNA por cada gramo de micelio húmedo.

4.7.2. Purificación de RNA de *Neurospora crassa*

4.7.2.1 Purificación de RNA total

El RNA se purificó empleando el método de N.M. Giles (Reinert *et al*, 1981) con modificaciones. Todo el material de vidrio fue horneado a 180°C por 2 horas, el material plástico fue autoclavado por 20 min a 140°C, al igual que los buffers utilizados. Esto se hace a fin de librar al material de posibles RNAasas contaminantes.

El micelio guardado a -70°C se molió en mortero con ayuda de N_2 líquido. El fino polvo obtenido se liofilizó durante 24 horas, a temperatura inicial de -50°C hasta que el vacío fue totalmente alcanzado, y luego a temperatura ambiente. El peso de micelio seco es aproximadamente 1/5 del peso del micelio previo a la liofilización, aunque este valor depende de las condiciones de filtrado.

Este fino polvo se volcó sobre una mezcla 1:1 de EB (NaAcO 0,3 M pH 5,2; EDTA 10 mM y SDS 4%) y PCA. Se utilizó 7,5 ml de EB por gramo de micelio seco. Se homogeneizó luego con un desintegrador de tejidos Ultra-Turrax durante 5 min a la máxima velocidad y se centrifugó por 10 min a 10.000xg a temperatura ambiente.

Se tomó la fase acuosa (superior) y se volcó sobre 1 1/2 vol PCA. La fase orgánica se lavó con 1/2 vol EB, y luego de homogeneizar y centrifugar en las mismas condiciones anteriores, se extrajo la fase acuosa y se agregó a la fase acuosa anterior. Se repitió el procedimiento con la

mezcla de fases acuosas y PCA, y luego de centrifugar la fase acuosa se extrajo con 1 vol de CA. A continuación, a la fase acuosa resultante se le agregó 1/20 vol de SDS 10% y se llevó a 100 µg/ml con una solución concentrada de proteinasa K. Se incubó por una hora a 37°C, se agregó 1 vol de PCA, se centrifugó 10 min a 10.000xg, y la fase acuosa se precipitó con 1/10 vol de NaAcO y 2 vol de etanol previamente enfriado a -70°C. Se centrifugó 10 min a 12.000xg, y luego de dejar secar bien el precipitado, el mismo se resuspendió bien en 2/3 de vol de H_2O respecto al volumen de EB usado originalmente. Se agregó entonces 3 vol de NaAcO 4 M pH 5,2, y se dejó 30 min en hielo. Se centrifugó luego 20 min a 15.000xg y el precipitado se resuspendió en el mínimo volumen de H_2O. Se guardó a -70°C hasta su uso. Se obtuvo aproximadamente 10 mg de RNA total por g de micelio seco original.

4.7.2.2 Cromatografía en oligo dT-celulosa

El RNA polyA (que está compuesto mayormente por mRNA) se purificó por cromatografía en oligo dT-celulosa (Aviv y Leder, 1972). Se utilizaron columnas de 1 ml de volumen asentado, con capacidad para procesar hasta 10 mg de RNA total. Salvo que se indique lo contrario, todas las operaciones se realizaron a temperatura ambiente y con material libre de RNAasa.

La oligo dT-celulosa se equilibró inicialmente con 5 vol (de columna) de buffer de carga B.C. (Tris-HCl 20 mM pH 7,6, LiCl 0,5 M, EDTA 1 mM y SDS 0,1%).

El RNA total, en una concentración no mayor a 2,5 mg/ml se incubó por 5 min a 65°C, desestabilizando de esta manera la estructura secundaria del mismo, se enfrió a

0°C y se agregó 1 vol de B.C. de doble concentración, y se sembró en la columna. El percolado se volvió a calentar 5 min a 65°C, se enfrió y se volvió a sembrar en la misma columna.

El percolado así obtenido, que es la fracción llamada polyA-, constituída en su mayor parte por RNA ribosomal, se precipitó con 2,5 volúmenes de etanol, 10 min a -70°C y luego se hizo una centrifugación de 10 min a 10.000 rpm. El precipitado se resuspendió en el menor volumen posible de H_2O libre de RNAsas.

A continuación, se lavó la columna con 10 vol de buffer de lavado (Tris-HCl 20 mM pH 7,6; LiCl 0,1 M; EDTA 1 mM y SDS 0,1%), y luego se eluyó el RNA polyA+ con 2 ml de H_2O bidestilada libre de RNAasas. Se precipitó el RNA poly A+ con NaAcO 3 M pH 5,2 y 2,5 vol de etanol absoluto. Se dejó a -70°C por 30 min y se centrifugó 10 min a 12.000xg. Se disolvió el precipitado en el menor volumen posible de H_2O y se guardó hasta su uso a -70°C.

Finalmente, la columna se regeneró con 3 vol de H_2O destilada, 3 vol de NaOH 0,1 M y luego se lavó con H_2O destilada hasta pH neutro. Si no se volvió a usar inmediatamente, se dejó secar y se guardó en esas condiciones a 4°C.

El RNA polyA+ así obtenido, corresponde a un 2% del RNA total y contiene aún un 50% de RNA ribosomal contaminante.

4.7.2.3 Cuantificación de ácidos nucleicos

4.7.2.3.1 Cuantificación de RNA

La cuantificación del RNA se realizó por el método de degradación ácida y posterior cuantificación de residuos de ribosa por la reacción del mismo con orcinol en presencia de $FeCl_3$ (Schneider, 1957).

Se prepara una solución de orcinol 1% (P/V), $FeCl_3 . 6 H_2O$ 0,5% (P/V) en HCl (c).

Se agrega 670 µl del reactivo recién preparado a 330 µl de solución de RNA y se incuba 20 min en baño de agua en ebullición. Se deja luego 5 min en hielo y se mide la densidad óptica a 660 nm. Se utiliza como standard polyA sintético, teniendo en cuenta que 10 µg dan aproximadamente 0,3 unidades de D.O. a 660 nm.

La ventaja del método es que si bien no es muy sensible (en estas condiciones el LD está por encima de los 2 µg de RNA), carece prácticamente de interferencias. En particular el DNA, principal causante de sobrevaloración de las concentraciones de RNA por lectura de absorbancia a 260/280, no reacciona con orcinol.

Las muestras fueron valoradas siempre por triplicado y se tomó el valor medio de las concentraciones obtenidas.

La dispersión entre triplicados nunca superó el 10%.

4.7.2.3.2 Cuantificación de DNA

Se midió la concentración de DNA por absorbancia a 260 nm. Una unidad de absorbancia es aproximadamente 50 µg/ml de DNA.

Para muestras en las cuales se sospechó la presencia de RNA o proteína que interfieren con dicha cuantificación, se corrió una breve electroforesis de la muestra en un gel de agarosa junto a cantidades conocidas de DNA de tamaños comparables a los DNA a dosar. Luego se tiñó con EtdBr y se fotografió la fluorescencia a la luz ultravioleta. La comparación de la intensidad de la muestra con el standard permitió estimar en forma aproximada la masa de DNA sembrada.

4.7.2.4 Selección de RNA mensajeros específicos por hibridación con DNA clonado

Los mRNA complementarios a las secuencias genómicas clonadas se purificaron por el método de hibridación-selección (Parnes *et al*, 1981). Se partió de 5 µg de RNA polyA obtenido de micelios tratados por 6 horas con cicloheximida. Se seleccionaron por hibridación con 10 µg de los DNAs correspondientes clonados en el fago λ.

El DNA fue previamente tratado con 100 µg/ml de proteinasa K por 60 min a 42°C, se extrajo con PCA y luego con CA, y luego se precipitó con 2,5 vol de etanol y 1/10 vol de NaAcO.

El precipitado se resuspendió en 50 µl de TE y se calentó 10 min en un baño de agua a 100°C, se enfrió rápidamente en hielo, se mezcló con 50 µl NaOH 1 M y se dejó 20 min a temperatura ambiente. Luego se puso en hielo y se neutralizó por agregado de 400 µl de NaCl 1,4 M, citrato de sodio 0,15 M y buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 adicionado con HCl 0,125 M de concentración final.

Por otro lado, se humedeció un trozo de nitrocelulosa con 2xSSC (20xSSC es NaCl 3 M y citrato de sodio 0,3 M pH 7,0) y se lo colocó en un aparato de filtración tipo Minifold (Scheicher and Schüll).

Los DNAs se sembraron sobre la nitrocelulosa, y se aplicó un vacío muy suave. Luego de 5 min de succión, se sacó el filtro del aparato, se dejó secar al aire y se horneó por 2 horas a 80°C. El DNA no unido a la membrana de nitrocelulosa se eliminó por un calentamiento de 1 min a 100°C en H_2O bidestilada. Se enfrió en hielo y se dejó secar sobre papel absorbente.

Los fragmentos de nitrocelulosa conteniendo cada uno 10 µg de DNA correspondiente a cada clon se prehibridaron en buffer de hibridación (HB), que contiene: 50% formamida; 0,9 M NaCl; 0,2% SDS; 1 mM EDTA; 20 mM PIPES pH 6,4) durante 10 min a temperatura ambiente. Se puso luego un filtro de nitrocelulosa por tubo y se agregó a cada uno 50 µl de HB conteniendo 5 µg de RNA polyA+ correspondiente a un micelio tratado por 6 horas con cicloheximida. Se dejó 6 horas a 37°C con agitación esporádica. Al cabo de este tiempo, se sacó el HB y se agregó a cada tubo 100 µl de WB (50% formamida; 20 mM NaCl; 8 mM citrato de sodio; 1 mM EDTA; 0,5% SDS) con 5 cambios en 15 min y a 37°C.

Se sacaron los filtros luego del lavado, y se escurrieron sin secar. Se pusieron en sendos tubos nuevos y se agregó 1 ml de H_2O bidestilada libre de RNAasas a cada uno, se agitaron por 5 seg con ayuda de Vortex por 2 veces, se descartó el H_2O, se agregó 300 µl de EDTA 1 mM pH 8,0 y se calentó 1 min a 100°C, enfriándose luego rápidamente en baño de etanol-hielo seco.

Se agregó luego a cada tubo 10 µl tRNA de levadura (1 mg/ml), 30 µl NaAcO 3M pH 5,2 y 850 µl etanol. Se dejó por 30 min a -70°C y luego se centrifugó 20 min a 14.000xg.

Se resuspendieron los precipitados en 5 µl de H_2O bidestilada (libre de RNAasas) en cada caso, y se guardaron a -70°C hasta su posterior utilización para experimentos de traducción *in vitro* con un kit de lisado de reticulocitos de conejo.

4.7.3. Purificación de DNA recombinante de los clones de fago λ

La purificación de DNA recombinante de fago λ se llevó a cabo esencialmente según Yamamoto *et al* (Yamamoto *et al*, 1970) a partir de 500 ml de lisado de bacterias.

Se agregó a los mismos RNAasa A y DNAasa I hasta una concentración final de 1 µg/ml de cada una para eliminar los ácidos nucleicos liberados procedentes de las bacterias, y se incubó por 30 min a 37°C. Se agregó luego NaCl hasta una concentración final de 1 M y se dejó por lo menos 1 h en hielo. Se centrifugó luego por 10 min a 10.000xg, y el sobrenadante se llevó a 10% PEG-8000 agregando droga sólida y se dejó 1 h más en hielo. Se centrifugó en las mismas condiciones, el precipitado se resuspendió en 10 ml de buffer SM y se extrajo con un 1 vol de cloroformo para eliminar el PEG residual. Se tomó la fase acuosa y se cosecharon los fagos por ultracentrifugación a 100.000xg a 4°C por 1 hora y fueron posteriormente resuspendidos en 500 µl de SM.

El DNA se liberó de la cápside proteica por una incubación de 1 h a 65°C en presencia de 20 mM EDTA; 50 µg/ml proteinasa K; 0,5% SDS. Al cabo de este tiempo, se extrajo con PCA y CA, y se precipitó la fase acuosa con 1/10 vol de NaAcO y 2 vol de etanol.

El precipitado obtenido luego de centrifugar, se resuspendió en 200 µl de H_2O y se trató con RNAasa A 100 µg/ml de concentración final, y se incubó 30 min a 37°C. Se agregó 10 µl de NaAcO 3 M pH 5,2 y 300 µl de etanol y se agitó con una varilla delgada de vidrio. El DNA enrollado a la misma se resuspendió en el mínimo volumen de buffer TE. Se obtuvo entre 100 y 500 µg de DNA del fago en cada preparación.

4.7.4. Purificación de plásmidos

Las purificaciones de plásmidos fueron llevadas a cabo por el método de Birnboim y Doly (Birnboim y Doly, 1979) con modificaciones. Para las minipreparaciones se partió de 5 ml de cultivo crecido toda la noche, y luego de centrifugar se resuspendieron las bacterias en 1 ml de TEG (Tris-HCl 25 mM pH 8,0; EDTA 10 mM y glucosa 50 mM). Todas las centrifugaciones se llevaron a cabo en una microcentrífuga Beckman para tubos Eppendorf a temperatura ambiente, salvo que se indique otra cosa. Las bacterias se volvieron a centrifugar por 2 min y se resuspendieron en 100 µl de TEG. Se agregó 200 µl SDS 1%, NAOH 0,2 M y se dejó 5 min en hielo. Se agregó luego 150 µl de NaAcO 3 M pH 5,2; se dejó otros 10 min en hielo y se centrifugó 5 min. (En esta etapa, en el caso de preparaciones en gran escala, el sobrenadante se pasa a través de un lecho de fibra de vidrio).

Se tomó el sobrenadante y se extrajo con 400 µl PCA y luego con 400 µl CA. Se precipitó el ácido nucleico con 1 ml de etanol previamente enfriado a -70°C, y se centrifugó 10 min. El precipitado se resuspendió en 200 µl de H_2O y se trató con 20 µl de RNAasa A 1 mg/ml por 30 min a 37°C. Se volvió a precipitar el DNA con 10 µl de NaAcO 3 M pH 5,2 y

300 µl de etanol durante 10 min a temperatura ambiente, y se centrifugó 5 min. El precipitado se resuspendió en 20 µl de H_2O.

El rendimiento fue de aproximadamente 2 µg de plásmido. Las preparaciones de plásmidos en gran escala se hicieron de la misma manera, pero a partir de 500 ml de células aumentando proporcionalmente los volúmenes.

4.7.5. Purificación de DNA simple cadena de fago M13

El método utilizado es básicamente el descripto por Messing (Messing, 1983). Se partió de una placa de retardo de crecimiento clara y se inoculó con ella 2 ml de medio LB. Se agregaron 20 µl de bacterias JM101 provenientes de un cultivo fresco con 8 a 10 horas de crecimiento (D.O. aproximadamente 1,2) en medio LB. Se dejó crecer entre 4 y 6 horas a 37°C con agitación enérgica.

Al cabo de este tiempo, se centrifugó el cultivo a 4.000xg por 10 min en centrífuga de mesa. Se pasó el sobrenadante a un tubo Eppendorf y se centrifugó por 5 min a 12.000xg en microcentrífuga.

Se pasó 1,2 ml del sobrenadante a otro tubo y se agregó 200 µl de una solución de PEG 20%-NaCl 2,5 M. Se agitó por inversión 10 veces y se dejó a temperatura ambiente por 15 min. Se centrifugó por 10 min a 12.000xg en microcentrífuga.

En esta etapa debe observarse un precipitado, y sólo se siguió adelante en caso que así fuera. Se descartó el sobrenadante cuidando de eliminarlo en su totalidad, y se resuspendió el precipitado en 100 µl de TE, se agregó 50 µl de PCA, se centrifugó y la fase acuosa se reextrajo con CA.

La fase acuosa se precipitó con 300 µl de una solución de etanol:NaAcO (pH 5,2) 3 M (25:1, V/V). Se dejó por una hora a -70°C o durante toda la noche a -20°C, se centrifugó por 10 min en microcentrífuga y se resuspendió el precipitado en 25 µl de TE.

Para secuenciar por Sanger o para experimentos de extensión de cadena, se usó 7 µl de estos 25 µl. El rendimiento es de aproximadamente 1-2 µg por minipurificación.

4.8. TRADUCCION *in vitro* DE RNA MENSAJERO

Tanto para la traducción *in vitro* de RNA mensajero total o seleccionado por hibridación, se utilizó un kit de lisado de reticulocitos de New England Nuclear Corp. en las condiciones indicadas por los fabricantes, con leves modificaciones. Las reacciones se llevaron a cabo en 12,5 µl, que corresponde a la mitad del volumen recomendado, y se utilizó una concentración de 80 mM de acetato de potasio y 0,65 mM de acetato de magnesio. Como isótopo radioactivo se utilizó L-[^{35}S] metionina (1134 Ci/mmol) en una concentración de 2 µCi por ml de reacción.

Las reacciones se llevaron a cabo a 37°C por 60 min y la incorporación se determinó de la manera antes descripta.

Teniendo en cuenta que cada preparación de RNA mensajero se traduce con una eficiencia distinta, se hizo en el caso de cada nueva preparación una curva de incorporación en función de la cantidad de RNA mensajero agregado a la mezcla de reacción. Las incorporaciones máximas se obtuvieron por lo general cuando se utilizó entre 0,5 y 1 µg de RNA mensajero. La incorporación alcanzó entre 10 y 50 veces los valores obtenidos en muestras control en las que el RNA se reemplazó con igual vol de H_2O estéril.

Las muestras se guardaron a -20°C hasta su posterior utilización para análisis por PAGE-SDS.

4.9. SEPARACION DE ACIDOS NUCLEICOS EN AGAROSA

4.9.1. Electroforesis de DNA y transferencia a filtros (*Southern blot*)

Distintas muestras de DNA fueron sometidas a electroforesis en geles de agarosa en buffer TAE 1x (TAE 50x: Tris-ácido acético 2 M pH 8,0; EDTA 50 mM). Las muestras se mezclaron con 1/3 vol de BPB (buffer TAE 3x, glicerol 50% y azul de bromofenol 0,25%), y se sembraron en los pocillos de geles horizontales de distintos tamaños y espesores dependiendo del volumen de las muestras a sembrar. Las electroforesis se llevaron a cabo aplicando un campo eléctrico de 5 V/cm. Una vez finalizada la electroforesis, los geles se tiñeron con EtdBr 0,5 µg/ml en H_2O durante 10 a 60 min. También se ha utilizado el método de incluir EtdBr en el gel en una concentración final de 0,5 µg/ml, desarrollándose luego la corrida electroforética en la forma habitual (Maniatis *et al*, 1982).

Los geles fueron fotografiados en un transiluminador de luz ultravioleta usando una cámara provista de filtro rojo, con película Polaroid 667. En estas condiciones se pueden detectar hasta 10 ng de DNA en una única banda de 5 mm de ancho (Sharp *et al*, 1973).

Para la transferencia, en el caso de DNA genómico se pretrató al gel por 10 min con HCl 0,25 N y luego se siguió el mismo tratamiento, ya fuese para DNA genómico o para DNA de cualquier otra fuente. El procedimiento común consistió en tratar el gel con NaOH 0,2 M y NaCl 0,6 M por 30 min y luego se lavó con buffer fosfato de sodio 0,025 M pH 6,5.

Finalmente, el DNA se transfirió por el método de Southern (Southern, 1975) por capilaridad, a un filtro de Gene Screen utilizando buffer fosfato de sodio 0,025 M pH 6,5 durante 12 horas. La membrana se horneó luego por 2 h a 80°C.

Como marcadores de peso molecular se utilizaron distintos DNAs cortados con enzimas de restricción dependiendo del tamaño de los fragmentos a analizar. Los tamaños correspondientes al fago λ cortado con Hind III son: (pb) 23130; 9416; 6555; 4361; 2322; 2067; 564 y 125. Los correspondientes al fago λ cortado con AvaII son: 8126, 6555, 6442, 3676, 2606, 2555, 2134, 2005, 1951, 1612, 1420, 1284, 985, 974, 894, 597, 590, 513, 511, 433, 398, 345, 310, 308, 272, 242, 215, 151, 88, 73, 67, 45, 42, 32, 23 pb. Los tamaños correspondientes al plásmido pGem-1 cortado con Hinf I son: 1198; 517; 396; 354; 190; 75; 65; 38 y 36 pb, respectivamente.

4.9.2. Purificación de fragmentos de DNA por electroforesis preparativa en geles de agarosa

En los casos que se indica, los fragmentos de restricción se purificaron de geles de agarosa por electroelución sobre membranas de diálisis.

Una vez que el fragmento de interés se hubo separado electroforéticamente de los otros fragmentos procedentes de la restricción del DNA original, se cortó la porción de gel que contenía dicha banda. El trozo de agarosa se colocó dentro de un pocillo recubierto con membrana de diálisis, hecho en un gel de agarosa. A continuación se aplicó un campo eléctrico de 5 V/cm por 15-30 min hasta comprobar con una lámpara ultravioleta portátil que todo el material se encontraba pegado a la membrana de diálisis. Se eluyó luego el

DNA de la misma por 3 lavados con 75 µl de H_2O en cada caso. Se agregó 15 µl de NaAcO 3 M pH 5,2 y 400 µl de etanol, y se dejó 10 min a -70°C. Se centrifugó 10 min a 12.000xg. El precipitado se resuspendió en el mínimo volumen de H_2O y se guardó a -20°C hasta su uso.

4.9.3. Electroforesis de RNA y transferencia a filtros (*Northern Blot*)

El RNA fue sometido a electroforesis en geles desnaturalizantes de agarosa 1,5%, con 6% formaldehído y buffer MAE 1x (buffer MAE 10x es MOPS-NaOH 0,2 M pH 7,0; NaAcO 50 mM y EDTA 10 mM) según el protocolo de Lehrach (Lehrach *et al*, 1977). La agarosa en porcentaje variable (entre 0,8 y 2%) se fundió en el volumen apropiado de H_2O destilada, se dejó enfriar hasta 65°C y luego se agregó formaldehído 37% y MAE 10x hasta llegar a la concentración indicada. Las muestras de RNA fueron tratadas por 15 min a 65°C con 6% formaldehído, MAE 1x y 50% formamida, y luego de dejarlas enfriar, se agregó EtdBr hasta una concentración final de 50 µg/ml. Esto permitió visualizar los RNA más abundantes (RNA ribosomales) en cualquier momento de la electroforesis. Los tamaños de los mismos son aproximadamente 4000 y 2000 nucleótidos (26S y 17S, respectivamente).

Finalizada la corrida, los geles fueron tratados por 30 min con NaOH 0,05 M para optimizar la transferencia en el caso de RNA mayores de 4 kb. Para la transferencia de transcriptos pequeños, este paso se reemplazó por un lavado de 30 min en H_2O. En ambos casos, luego se transfirió directamente por el método de capilaridad de Southern a Gene Screen (nylon), empleando como buffer de transferencia, $NaPO_4H_2$-

Na_2PO_4H 0,025 M pH 6,5. Las transferencias se prolongaron entre 6 y 24 horas. La eficiencia fue directamente verificada sobre la membrana de nylon por la característica fluorescencia del EtdBr unido a los RNA más abundantes al irradiar la membrana con luz ultravioleta. Se enjuagó luego brevemente la membrana con el buffer de transferencia y se horneó por 2 horas a 80°C para eliminar el formaldehído.

4.10. PREPARACION DE SONDAS RADIACTIVAS

Podemos dividir a las sondas radiactivas en 5 tipos distintos, según los templados usados y el uso que se les dio.

4.10.1. Síntesis de DNA copia (cDNA) a partir de RNA mensajero

Se sintetizó [^{32}P] cDNA de alta actividad específica a partir de RNA polyA purificado de micelios inducidos. Para ello, se mezcló en un tubo Eppendorf 1 µg de RNA polyA+ con 2 µg de oligo dT$_{12-18}$ en un volumen de 18 µl y se calentó a 80°C por 2 min en baño de agua dejándolo luego enfriar lentamente hasta llegar a una temperatura menor de 42°C.

Las condiciones de reacción fueron las siguientes: Tris-ClM 50 mM pH 8,3; MgCl$_2$ 5 mM, KCl 30 mM, DTT 2 mM, dGTP 50 µM, dCTP 50 µM, dTTP 50 µM, dATP 2,5 µM; α[^{32}P]dATP (3000 Ci/mmol) 50 µCi y 20 unidades de transcriptasa reversa del virus de la amieloblastosis aviar (AMV) y se incubó por 3 h con otro agregado equivalente de enzima a los 90 min de reacción. La reacción se detuvo por agregado de 5 µl de EDTA 0,5 M pH 8,0. Luego se incubó a 37°C por 30 min con 6,5 µl de NaOH 3 M para hidrolizar el templado de RNA y se neutralizó con 6,5 µl de ácido acético 3 M. A continuación se separó la radiactividad no incorporada, ya sea por cromatografía en una columna de 2 ml de Sepharosa Cl-4B o por 2 precipitaciones consecutivas con 2 vol de etanol y 1/ 10 vol de NaAcO 3 M pH 5,2 resuspendiendo cada vez en 50 µl de H$_2$O estéril.

En ambos casos se hizo una precipitación final del cDNA con 2,5 vol de etanol y 1/10 vol de NaAcO 3 M pH 5,2.

Las sondas de cDNA enriquecidas en secuencias inducibles por cicloheximida se lograron hibridando el cDNA obtenido con un exceso de 500 veces en masa de RNA polyA+ purificado de un micelio no tratado con el inhibidor. La hibridación se llevó a cabo en 200 µl de 5xSSC, Denhardt 5x (Denhardt 50x es BSA 5%, PVP 5%, ficoll 5%), SDS 0,1%, DNA de timo de ternero desnaturalizado 100 µg/ml, polyA sintético 1 µg/ml y formamida 50% durante 12 horas a 42 °C.

4.10.2. Marcado de DNA doble cadena

Los DNAs clonados, ya sea DNA de fago λ o DNA plasmídico, fueron marcados por *nick translation*, por extensión de *primers* no específicos o por rellenado de extremos cohesivos resultantes de cortes con enzimas de restricción.

En el primer caso, se utilizó un kit de New England Nuclear, de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes. Se llevó a cabo las reacciones en 12,5 µl con 25 µCi de [α^{32}P] dCTP y 250 ng de DNA. Se obtuvo aproximadamente 12 µCi de sonda con una actividad específica de 10^8 cpm/µg.

En el segundo caso se utilizó un kit de Amersham, también de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes, utilizando entre 50 y 100 µg de DNA lineal y 25 µCi de [α^{32}P] dCTP. Se obtuvo aproximadamente 18 µCi de sonda con una actividad específica de 5.10^8 cpm/µg.

En ambos casos, cuando fue necesario, se separó la radioactividad no incorporada por precipitaciones consecutivas con etanol o por cromatografía en Sepharosa CL-4B.

Las sondas fueron desnaturalizadas por 5 min a 100°C antes de usarse.

En el caso de DNAs marcados por rellenado de extremos 5´ protruyentes, se incubó 1 µg del DNA cortado por 50 min a 37°C en buffer 2 de restricción con la enzima de restricción adecuada. Luego se agregó 1 µl de una mezcla de 3 deoxinucleótidos trifosfato (0,5 mM cada uno), 20 µCi del deoxinucleótido trifosfato faltante marcado con ^{32}P en la posición α (de actividad específica >3000 Ci/mmol), 1 µl de buffer 2 de restricción concentrado 10 veces y 0,5 U del fragmento de Klenow de la DNA polimerasa I. El volumen se ajustó a 30 µl con H_2O, y se dejó durante 20 min a temperatura ambiente. Luego se agregó 1 µl de los 4 deoxinucleótidos trifosfatos (0,25 mM cada uno) y se dejó por 10 min más a temperatura ambiente.

Por lo general, estos DNAs debían ser luego cortados con otra enzima de restricción, por lo que se inactivó la enzima Klenow por calentamiento a 70°C por 20 min. En los casos en que fuera necesario, se cortó con la enzima adecuada y se aisló el fragmento de interés por electroforesis preparativa en geles de poliacrilamida.

4.10.3. Síntesis de DNA simple cadena marcado con [^{32}P]

Se mezcló entre 500 ng y 2 µg de DNA de M13 simple cadena obtenido por el método descripto anteriormente, correspondiente al clon de interés con 3 µl de buffer 2 de restricción y 3 µg de *primer* específico (20-mer) complementario a la zona de M13, 36 nucleótidos *downstream* del sitio HindIII de M13mp18 y se agregó H_2O destilada hasta completar 30 µl. Se calentó a 85°C por 2 min en baño de agua y se dejó llegar a temperatura ambiente lentamente.

Se agregó luego 1 µl de dTTP 5 mM, 1 µl de dCTP 5 mM y 1 µl dGTP 5 mM, 3 µl de buffer 2 de restricción, 2,5 µl de [α^{38}P] dATP (3000 Ci/mmol) y 2 µl de enzima Klenow (1 U/µl). Se llevó a 50 µl con H_2O destilada. Se incubó por 50 min a temperatura ambiente y luego se agregó 3 µl de una mezcla de los 4 dNTP 1 mM cada uno, y se dejó otros 30 min a temperatura ambiente. Al cabo de este tiempo, se inactivó la enzima por calentamiento a 70°C por 20 min y luego se llevó a cabo el corte con las enzimas de restricción adecuadas a cada caso, en las condiciones descriptas.

La secuencia de interés se obtuvo de electroforesis preparativa en geles de poliacrilamida. Se comprobó que este DNA debe ser utilizado rápidamente luego de la síntesis, ya que debido a su alta actividad específica (10^9 cpm/µg) la radiólisis es muy alta.

4.10.4. Síntesis *in vitro* de RNA marcado con ^{32}P

Los plásmidos pGem (Promega Biotec) tienen los promotores para las T7-RNA polimerasas y SP6-RNA polimerasa, uno de cada lado en las regiones flanqueantes al sitio de clonado en orientaciones invertidas.

Se aprovechó ésto para sintetizar ribosondas complementarias a secuencias clonadas en estos plásmidos para ser utilizadas como sondas en experimentos de mapeo de RNA por digestión con nucleasa S1.

Para ello, se cortaron los DNAs clonados en pGem con la enzima adecuada en cada caso, y luego de realizar la restricción en las condiciones descriptas, se extrajo con PCA y CA, y se precipitó con etanol en la forma habitual. Se resuspendió el precipitado de manera que la concentración final de DNA fuera de 1 µg/µl.

Se mezcló 1 µl de este DNA clonado y cortado, con 2 µl DTT 100 mM, 1 µl RNAsin 40 U/µl, 1 µl GTP 240 µM, 1 µl CTP 10 mM, 1 µl ATP 10 mM, 1 µl UTP 10 mM, 30 µCi de [α^{32}P] GTP (3000 Ci/mmol), 4 µl T.B. 5x (T.B. 5x es Tris-HCl 200 mM, pH 7,5; 30 mM $MgCl_2$; 10 mM espermidina, 50 mM NaCl) y 20 unidades de SP6-RNA polimerasa. Se llevó a 20 µl con H_2O libre de RNAsas. Se incubó por 60 min a 37°C y luego se extrajo con PCA y CA y se precipitó con etanol en la forma habitual. Se resuspendió luego en el buffer apropiado dependiendo del uso a darle. Se obtuvo entre un 50 y un 80% de la radiactividad incorporada y una actividad específica de 10^9 cpm/µg de RNA.

4.11. MAPEO DE RNA CON NUCLEASA S1

Para mapear las zonas de los DNAs clonados que correspondían a exones transcriptos en el RNA maduro, se aprovechó la capacidad de la nucleasa S1 de degradar RNA o DNA simple cadena sin afectar los híbridos DNA-RNA o duplex RNA-RNA.

Se utilizó como sondas radiactivas, fragmentos de DNA marcados con ^{32}P en un extremo, fragmentos de DNA uniformemente marcados con ^{32}P o RNA uniformemente marcado.

Se mezcló 50 µg de RNA total extraído de micelios tratados por 6 horas con cicloheximida con aproximadamente $3x10^6$ cpm de sonda y se precipitó con etanol en las condiciones habituales. Se resuspendió en 20 µl de R-loop buffer (80% formamida, 400 m- NaCl, 1 mM EDTA, 40 mM PIPES pH 6,7) y 50 µl de vaselina. Luego se calentó a 20°C por arriba de la temperatura de hibridación por 15 min y sin dejar enfriar, se pasó al baño a la temperatura de hibridación. Las temperaturas de hibridación fueron 65°C para híbridos RNA-RNA si el tiempo de hibridación fue menor de 6 horas. Cuando el tiempo de hibridación fue mayor de 8 horas o con híbridos RNA-DNA (12 horas de hibridación), la temperatura usada fue de 52°C.

Una vez finalizado el período de hibridación, se agregó 200 µl de buffer S1 (NaCl 280 mM, $ZnSO_4$ 4,5 mM; NaAcO 30 mM; pH 4,6) y 300 unidades de nucleasa S1 (unidades definidas sobre 1 min de reacción). Se incubó a 37°C por 1 h y luego se extrajo con PCA y se precipitó en la forma habitual con etanol. El precipitado se resuspendió en F.D. (formamida 80%, Tris-borato 50 mM pH 8,3; EDTA 1 mM, xilenecianol 0,1% P/V y 0,1% BPB 0,1% P/V) y se calentó 3 min a 100°C previo al análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes.

Como control se siguió el mismo procedimiento con una muestra a la cual no se le agregó RNA total.

4.12. AISLAMIENTO DE SECUENCIAS INDUCIBLES POR CICLOHEXIMIDA

Se utilizó una biblioteca genómica proveniente de digerir DNA de *N. crassa* parcialmente con EcoRI. Estos fragmentos se insertaron en el vector λL47.1 (Loenen y Brammar, 1980). Esta genoteca fue obsequiada gentilmente por el Dr. John A. Kinsey.

Se plaquearon 20.000 pfu en 4 cajas de Petri de 15 cm de diámetro, lo que hace 80.000 pfu totales, es decir aproximadamente 12 equivalentes genómicos de *N. crassa*. Se transfirieron a nitrocelulosa, siguiendo la técnica de Benton y Davis (Benton y Davis, 1977). Se prepararon 3 réplicas en nitrocelulosa para hibridar con un cDNA obtenido de RNA de micelio tratado por 6 horas con 2 µM cicloheximida, con cDNA obtenido de RNA de micelio previo al tratamiento. Como control de la representatividad de todas las secuencias en la genoteca, la tercera réplica fue hibridada con el DNA del plásmido pGem 2-30A, que codifica para una secuencia inducible por cicloheximida (Aisemberg *et al*, 1988). Los fagos se transfirieron a discos de nitrocelulosa de 14 cm de diámetro que fueron apoyados suavemente sobre el cultivo, y se dejó en contacto por 30 seg para el primer filtro, 60 seg para el segundo, y 90 seg el tercero. Luego se dejó cada filtro en NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M por 1 min, en Tris-HCl 0,5 M pH 7,5, NaCl 1,5 M por 4 min y en SSC 2x por otros 4 min, en ese orden, Se dejaron luego secar al aire y se hornearon por 2 h a 80°C.

Los filtros fueron hibridados con la sonda adecuada en cada caso, como se describió para hibridación con 100% de homología. Luego del lavado y autoradiografiado, se extrajeron aquellas placas de lisis que habían dado positivas con

el cDNA competido con RNA extraído de micelio no tratado con cicloheximida (ver sección 4.10.1), pero negativo con las otras 2 sondas, lo cual me permitió estar seguro de que el clon aislado correspondía a una secuencia inducible distinta del gen clonado en el pGem 2-30A.

Estos positivos fueron reexaminados a baja densidad (50-100 pfu/placa de Petri de 9 cm de diámetro) hibridando con la sonda de cDNA competida.

4.13. CONDICIONES DE HIBRIDACION

En todas las hibridaciones se usó aproximadamente 5x 10^5 cpm de sonda por ml de solución de hibridación y alrededor de 50 µl de sonda por cm^2 de membrana. Las hibridaciones y los lavados se llevaron siempre a cabo en bolsas de polietileno selladas, con agitación moderada en baños de agua. Se usaron las mismas condiciones tanto para nylon como para nitrocelulosa.

Las condiciones de hibridación para alta homología (>90%) fueron las siguientes:

Los filtros se prehibridaron por al menos 2 horas a 42°C en buffer de hibridación de alta homología (SSC 5x, Denhardt 5x, poly A sintético 1 µg/ml, DNA de timo de ternera desnaturalizado 100 µg/ml, SDS 1% y formamida 50%) y luego se inyectó con jeringa la sonda en el menor volumen posible del mismo buffer. Se dejó hibridando entre 6 y 24 h dependiendo de la actividad específica de la sonda, y luego se lavó en condiciones de alta homología que consiste en 2 lavados de 30 min cada uno a 65°C con SSC 0,2x, 1% SDS.

Las condiciones de hibridación de baja homología (aproximadamente 65%) consisten en un buffer de hibridación de baja homología (4xSSC, Denhardt 5x, polyA sintético 1 µg/ml, DNA de timo de ternera desnaturalizado 100 µg/ml, SDS 1% y formamida 23,6%) con el mismo tiempo de prehibridación e hibridación y se eliminó la marca no específica con 2 lavados de 60 min cada uno a 50°C con SSC 1x y 1% SDS.

Los filtros se secaron al aire y se autorradiografiaron, ya sea a temperatura ambiente o a -70°C con pantalla amplificadora según se indica en cada caso particular.

4.14. ELECTROFORESIS DE ACIDOS NUCLEICOS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Se emplearon geles planos de poliacrilamida de 20x 35 cm o de 40x35 cm y de 0,4 mm de espesor.

Se utilizó una solución stock de acrilamida: bisacrilamida (40:2) 40%. Al volumen adecuado de esta solución de acrilamida, se agregó TBE 5x (54 g de Tris; 27,5 g de ácido bórico y 20 ml de EDTA 0,5 M pH 8,0 por litro) en cantidad como para dejar 1x final.

Los geles nativos se polimerizaron en estas condiciones, mientras que a los desnaturalizantes se les agregó urea sólida hasta 7 M final y luego de disolverla, se los polimerizó.

Las corridas electroforéticas se llevaron a cabo a 36 W en el caso de los geles más chicos, y a 60 W en el caso de los más grandes. Una vez finalizada la electroforesis, se fijó con ácido acético 10%, metanol 10%, se secó en un aparato secador de geles y se autorradiografió.

En el caso de los geles de acrilamida preparativos, el procedimiento que se siguió fue el mismo, sólo que los geles no se fijaron ni secaron. Se autorradiografió por 10 min a temperatura ambiente y luego se cortó la banda de interés del gel y se incubó a 37°C por 12 h en 400 µl de AcONa 0,3 M pH 5,2. Al cabo de este tiempo, se retiró el trozo de poliacrilamida y se precipitó con 2 vol de etanol.

4.15. SECUENCIACION DE DNA

Para la secuenciación de DNA se usó principalmente el método de los dideoxinucleótidos, aunque también se usó en algunos casos el método de degradación química de Maxam y Gilbert (Maxam and Gilbert, 1980).

4.15.1. Secuenciación de DNA por el método de dideoxinucleótidos

Para la secuenciación por este método se utilizó un kit de secuenciación (Sequenase, USB Corp.). Se siguieron estrictamente las instrucciones de los fabricantes, utilizándose entre 100 y 500 µg de los subclones de M13 simple cadena por reacción y como nucleótido radiactivo 5 µCi de [α-^{35}S] dATP (1250 Ci/mmol) por reacción. Las electroforesis se llevaron a cabo como se describió antes, en geles de acrilamida 6 a 8% y 7 M urea. Una vez secados se expusieron por 48 a 72 h a temperatura ambiente.

4.15.2. Secuenciación de DNA por el método de Maxam y Gilbert

Se siguió estrictamente el protocolo descripto por los autores, usándose como sustrato un fragmento de DNA marcado en un extremo por rellenado de extremos protruyentes (Ver Sección 4.10.2) con ^{32}P y extraído de acrilamida por el método antes mencionado.

Luego de las reacciones, las muestras se sometieron en el mismo día a electroforesis en geles de acrilamida/urea, como se describió en secciones anteriores.

5. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1. EFECTOS INMEDIATOS PRODUCIDOS *IN VIVO* POR BAJAS CONCENTRACIONES DE CICLOHEXIMIDA SOBRE LA VELOCIDAD DE SINTESIS PROTEICA

5.1.1. Incorporación de L-^{35}S metionina

Para estudiar el efecto de la cicloheximida sobre la velocidad de biosíntesis de proteínas a muy cortos tiempos luego del agregado del inhibidor, se trataron cultivos estacionarios de *Neurospora crassa* crecidos en las condiciones descriptas en Materiales y Métodos, y se determinó la velocidad de incorporación de L-^{35}S metionina a material precipitable por TCA (Ver Materiales y Métodos) a distintos tiempos luego del agregado de 2 µM cicloheximida (Figura 3).

Los resultados indicarían que existe una inhibición inicial de la incorporación de L-^{35}S metionina a proteínas que alcanza valores superiores al 80% en la primera hora, para recuperarse entre las 3 y 6 horas luego de iniciado el tratamiento, alcanzando valores entre 2 y 3 veces mayores respecto del mínimo, o sea aproximadamente 45% de incorporación respecto al control sin tratamiento. Este aumento se podría deber a la síntesis de los polipéptidos inducibles que se describe en la sección siguiente.

Los resultados de la incorporación a material TCA insoluble implican una medida del transporte del aminoácido al interior de la célula más su incorporación al pool de macromoléculas (mayormente proteínas) previa dilución del aminoácido radioactivo en el pool de aminoácidos endógeno.

De este modo, para poder sacar alguna conclusión de la comparación de los valores de incorporación a material TCA insoluble entre las distintas condiciones, es necesario

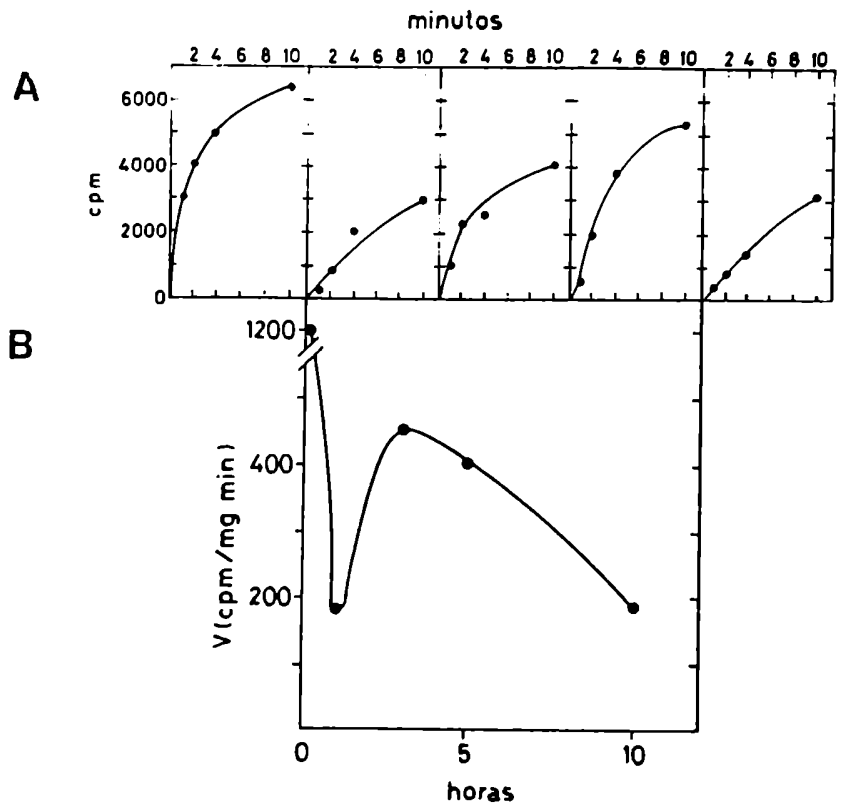


Figura 3: Efecto de la cicloheximida sobre la velocidad de incorporación de L-^{35}S metionina

A) Incorporación de L-^{35}S metionina a material TCA insoluble en alícuotas de cultivos a 0, 1, 3, 5 y 10 horas luego del agregado de 2 µM cicloheximida.

B) Velocidad de incorporación de L-^{35}S metionina en función del tiempo de agregado del inhibidor calculado a partir de las pendientes de A).

demostrar que no existen diferencias en la entrada del aminoácido radioactivo y en la dilución isotópica que el mismo sufre en el pool endógeno de metionina.

Se ha comprobado que apenas entre un 5% y un 20% de la radioactividad total internalizada se incorpora a material TCA insoluble (resultados no mostrados), por lo que no sería esperable que la entrada de L-^{35}S metionina fuese el factor que regula su incorporación.

Por otro lado, el dosaje de metionina total en extractos solubles de cultivos previo y 6 horas luego del agregado de cicloheximida 2 µM por el método colorimétrico de Mc.Carthy y Suvillan (Mc.Carthy y Suvillan, 1941), demostró que no existen diferencias significativas entre ambas condiciones, por lo que parece razonable una correlación entre la velocidad de incorporación de L-^{35}S metionina y la velocidad de síntesis proteica.

5.1.2. Inducción temprana de polipéptidos

El tratamiento de cultivos de *Neurospora crassa* en fase estacionaria con 2 µM cicloheximida produce la inducción de ciertas actividades enzimáticas luego de las 24 horas de agregado el antibiótico (ver Introducción).

Sin embargo, no ha sido descripta la respuesta temprana de *N. crassa* u otro organismo similar a concentraciones de cicloheximida capaces de producir sólo una inhibición parcial de la síntesis proteica.

Teniendo en cuenta que el tiempo de duplicación de *Neurospora crassa* en fase logarítmica es de 3-4 horas (ver Introducción), se llamó "tempranos" a los tiempos menores o iguales a 3 horas.

Para estudiar este efecto temprano de la cicloheximida sobre el perfil polipeptídico, se analizó la incorporación *in vivo* de L-^{35}S metionina por electroforesis en geles de acrilamida-SDS (PAGE-SDS).

Extractos provenientes de cultivos en fase estacionaria de 1 a 3, 3 a 5, 5 a 7, 22 a 24 y 46 a 48 horas luego del tratamiento con cicloheximida 2 µM o sin tratamiento alguno, fueron obtenidos como se indicó en Materiales y Métodos (Figura 4). En todos los carriles se sembró la misma cantidad de cpm, exceptuando el carril 2 donde se empleó la décima parte debido a la baja cantidad de radioactividad incorporada.

El análisis permitió clasificar las proteínas en 3 grupos distintos: aquéllas que se encuentran presentes en el cultivo previo al tratamiento y no se observan luego del agregado de cicloheximida; aquéllas cuya síntesis no es significativamente afectada por el antibiótico y, finalmente, un grupo de proteínas que aparecen exclusivamente luego del agregado del inhibidor.

Al menos 4 polipéptidos de este último grupo se pueden observar dentro de las 6 horas posteriores al tratamiento y corresponden a proteínas de 99 kD, 70 kD, 31 kD y 27 kD, siendo estas dos últimas claramente sintetizadas inclusive antes de las 3 primeras horas luego de iniciado el tratamiento. Asimismo, a tiempos posteriores se observa la aparición de otros polipéptidos, entre los que cabe destacar por su abundancia uno de 45 kD.

La aparición de los polipéptidos de 27 kD y 31 kD entre 1 y 3 h luego del agregado de cicloheximida 2 µM coincidiría temporalmente con el período en el cual la síntesis proteica es mínima (Figura 3). Por otro lado, puede observarse que el polipéptido de 31 kD todavía se sintetiza 72

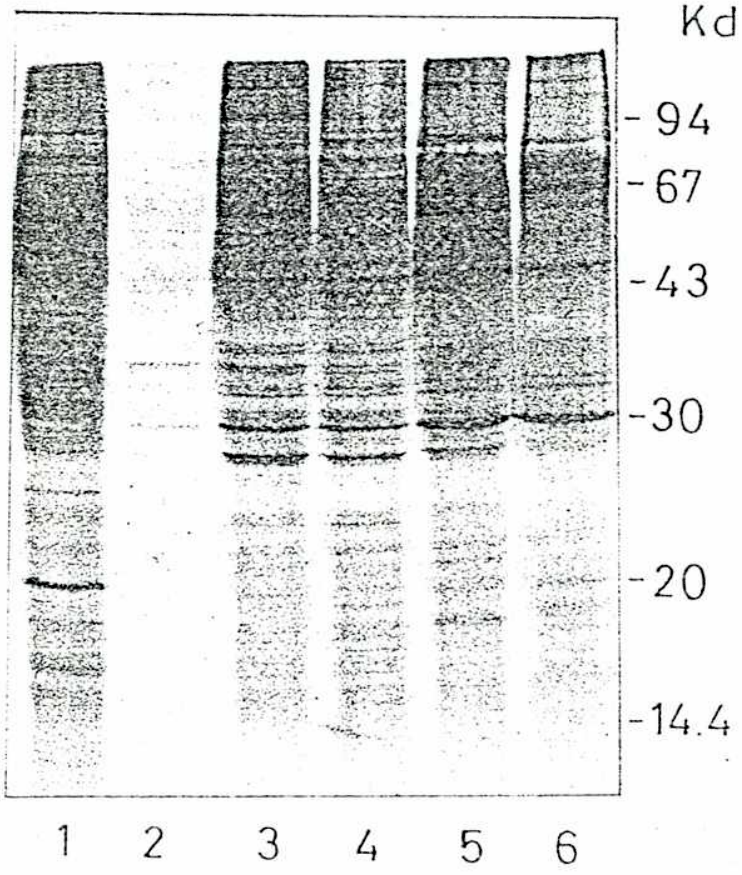


Figura 4: Inducción de polipéptidos por tratamiento con 2 µM cicloheximida

12% PAGE-SDS de proteínas marcadas *in vivo* con L-^{35}S metionina (≈10^5 cpm por carril, excepto en el carril 2, donde se sembró 10^4 cpm). Cultivos de 60 hs de crecimiento fueron incubados por 2 hs con L-^{35}S metionina antes (carril 1) o 2) 1 h, 3) 3 hs, 4) 5 hs, 5) 24 hs y 6) 48 hs luego del agregado de 2 µM cicloheximida.
Exposición de 7 días.

horas luego del agregado de cicloheximida, mientras que el de 27 kD comienza a desaparecer ya 48 horas luego de agregado el inhibidor.

El tratamiento con 0,25 µM cicloheximida que corresponde a 10-20% de inhibición de la síntesis proteica (resultados no mostrados), es suficiente para producir la inducción de los polipéptidos de 27 y 31 kD, cuya síntesis sería además insensible a una inhibición mayor del 90% tal como se obtiene con 10 µM cicloheximida por 6 horas (Figura 5). Por otra parte, el tratamiento con 10 µg/ml cicloheximida que inhibe totalmente la síntesis proteica asociada a ribosomas citoplasmáticos y sólo permite el funcionamiento de ribosomas mitocondriales (Sebald *et al*, 1969), no produce la inducción de estas proteínas por lo que podemos concluir que la traducción de las mismas ocurre en ribosomas citoplasmáticos y no mitocondriales (resultados no mostrados).

5.1.3. Efecto de la cicloheximida en una cepa resistente al antibiótico

La cepa 4071 (cyh-2) de *Neurospora crassa* contiene una mutación en una proteína ribosomal lo que la hace resistente al tratamiento con cicloheximida (Kreader y Heckman, 1987).

Si la expresión de las proteínas inducibles antes mencionadas fuera causada por la presencia de la cicloheximida *per se*, igualmente debería verificarse en la cepa resistente, ya que la permeabilidad al antibiótico no se encuentra modificada (Kreader y Heckman, 1987).

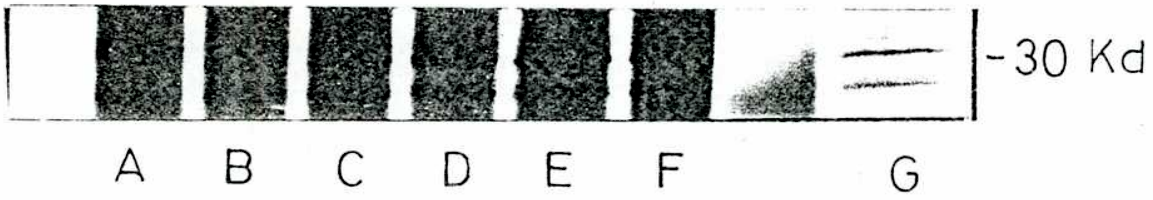


Figura 5: Efecto de distintas concentraciones de cicloheximida sobre la inducción de las proteínas de 27 kD y 31 kD

12% PAGE-SDS de proteínas marcadas con L-^{35}S metionina (≈10^6 cpm por carril, excepto carril G que tiene la décima parte).
A) sin cicloheximida, B) 0,1 µM, C) 0,25 µM, D) 0,5 µM, E) 1 µM, F) 2 µM, G) 10 µM cicloheximida. Las marcaciones se llevaron a cabo por 2 hs entre las 4 y las 6 hs de agregado el inhibidor.
Exposición de 48 horas.

Ahora bien, si la inducción de dichos polipéptidos se debe a la inhibición parcial de la síntesis proteica, no debería verificarse en la cepa 4071 en que la cicloheximida no puede ejercer su efecto inhibitorio.

El efecto del tratamiento de la cepa 4071 (cyh-2) con 2 µM cicloheximida se estudió a nivel de la incorporación de L-^{35}S metionina y por análisis de los productos marcados por PAGE-SDS (Figura 6). Se encontró que no existe inhibición de la incorporación de L-^{35}S metionina a material TCA insoluble luego de 6 horas de tratamiento en cultivos de fase estacionaria de la cepa 4071. Asimismo, en la Figura 6 se observa que no existe diferencia alguna en los patrones polipeptídicos de las condiciones con o sin tratamiento con el inhibidor.

Se concluye que el efecto de la cicloheximida sobre la inducción de los polipéptidos antes mencionados en la cepa salvaje, se verifica solamente cuando se afecta la velocidad de biosíntesis de proteínas.

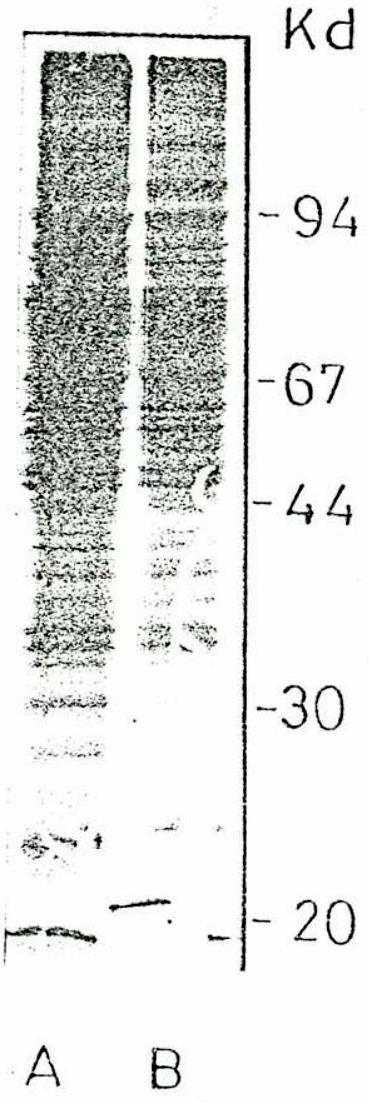


Figura 6: Efecto de la cicloheximida sobre la cepa resistente (cyh-2)

12% PAGE-SDS de proteínas marcadas con L-^{35}S metionina (≈1.10^{6} cpm por carril)
A) Homogenato de la cepa cyh-2 sin tratar con cicloheximida,
B) homogenato de la cepa cyh-2 luego de 6 horas de tratamiento con 2 µM cicloheximida.
Exposición de 18 horas.

5.2. EFECTOS DE LA PUROMICINA SOBRE LA INDUCCION DE PROTEINAS

El tratamiento con puromicina se llevó a cabo sobre cultivos de *Neurospora crassa* en estado estacionario esencialmente como se describió para el tratamiento con cicloheximida. Se emplearon distintas concentraciones del antibiótico, entre 1 µM y 1 mM, y se analizó por PAGE-SDS el perfil polipeptídico de extractos de los correspondientes micelios marcados con L-^{35}S metionina luego de 6 horas de tratamiento (Figura 7). Se observa que las proteínas de 99 kD y 31 kD aparecen con 30 µM de puromicina, lo que corresponde a una inhibición de aproximadamente 30% en la incorporación de L-^{35}S metionina a material TCA precipitable. Estos resultados demuestran que la aparición de las proteínas de 99 kD y 31 kD ocurre como consecuencia de la inhibición de la síntesis proteica, independientemente del camino por el cual ésta se logre, ya que la cicloheximida y la puromicina actúan a niveles diferentes (ver Introducción).

No puede descartarse que las otras dos proteínas (70 kD y 27 kD) se sinteticen en menor proporción y no se hayan visualizado en la autorradiografía, o alternativamente, que la inhibición con puromicina deba ser mayor para que dichas proteínas se induzcan, ya que concentraciones de puromicina 1 mM producen apenas una inhibición del 50% de la síntesis proteica en *Neurospora crassa*.

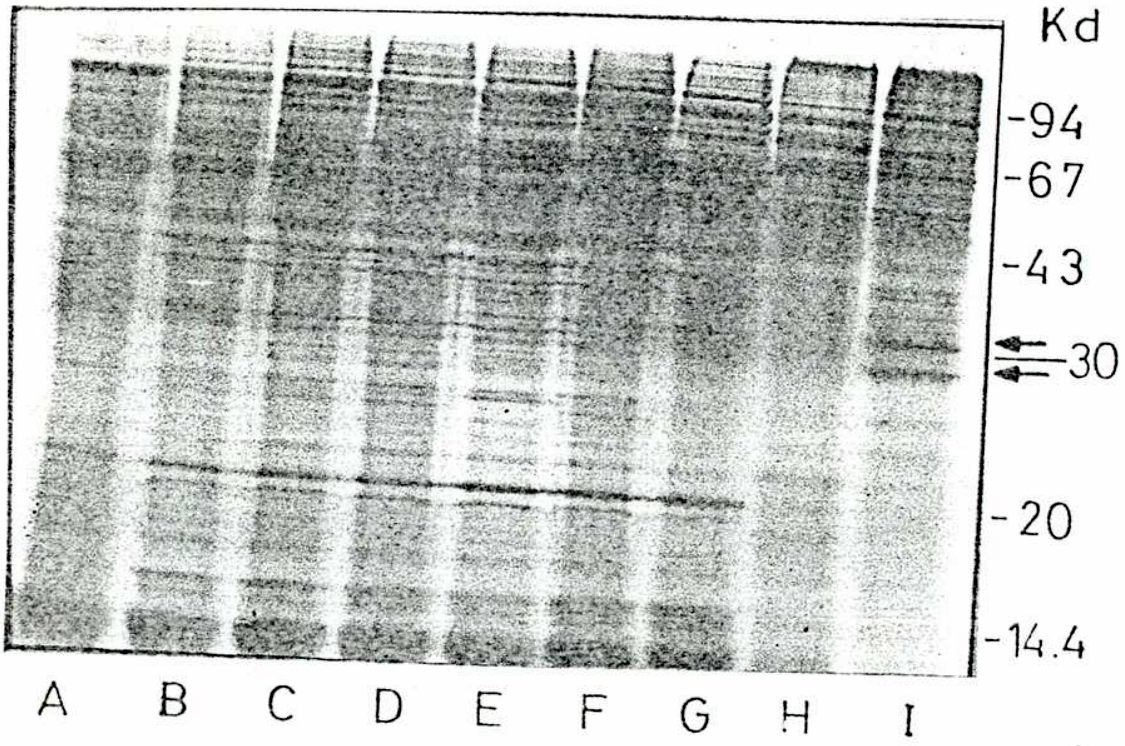


Figura 7: Efecto de la puromicina en la inducción de proteínas

12% PAGE-SDS de proteínas marcadas con L-^{35}S metionina (≈4.10^5 cpm por carril).
A) y H) sin tratamiento, micelios tratados con: B) 1 µM, C) 5 µM, D) 30 µM, E) 100 µM, F) 500 µM, G) 1 mM puromicina por 6 h, e I) con 2 µM cicloheximida por 6 h.
Exposición de 72 h.

5.3. INDUCCION DE LOS POLIPEPTIDOS DE 31 KD Y 27 KD EN CULTIVOS EN FASE LOGARITMICA

El tratamiento con 2 µM cicloheximida por 6 horas de cultivos en fase logarítmica (18 horas de crecimiento) suplementados con 0,5% o 2% sacarosa, fue estudiado por incorporación de L-^{35}S metionina y posterior PAGE-SDS tal cual se describió en Materiales y Métodos.

En cultivos logarítmicos en ambas condiciones se observa la inducción de las proteínas de 27 kD y 31 kD (Figura 8), lo cual indicaría que el efecto de la cicloheximida respecto a la inducción de estos polipéptidos es independiente del estado metabólico del micelio sometido al tratamiento con el inhibidor.

Los perfiles polipeptídicos son muy diferentes en extractos de cultivos en fase logarítmica o fase estacionaria, antes del tratamiento con cicloheximida, mientras que luego de 6 horas de tratamiento se hacen casi idénticos (resultados no mostrados), lo cual podría indicar que la inducción o inhibición de proteínas luego del agregado del inhibidor es independiente de las condiciones iniciales del cultivo y las reservas metabólicas al momento del tratamiento.

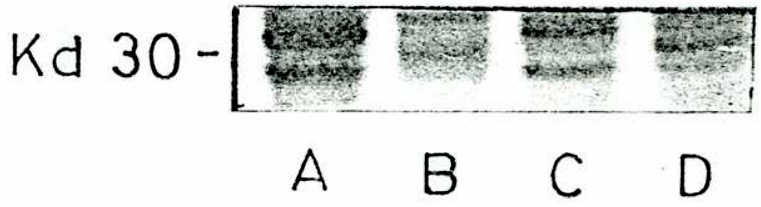


Figura 8: Inducción de las proteínas de 27 kD y 31 kD en cultivos en fase logarítmica con cicloheximida 2 µM

12% PAGE-SDS de proteínas marcadas con L-^{35}S metionina (≈10^6 cpm por carril). Cultivos de 18 horas de *Neurospora crassa* (fase logarítmica) en medio mínimo con C) y D) 2% sacarosa, A) y B) 0,5% sacarosa. A) y C) no tratados, B) y D) tratados con 2 µM cicloheximida por 6 hs.
Exposición de 24 horas.

5.4. TRANSCRIPCION DIFERENCIAL PROMOVIDA POR CICLOHEXIMIDA

Se ha demostrado en las secciones anteriores la síntesis de al menos 4 nuevas proteínas por el agregado de concentraciones micromolares de cicloheximida. Si el control de esta respuesta estuviera situado a nivel transcripcional, el agregado del antibiótico debería producir un aumento en la concentración de determinados mRNAs, como consecuencia de un incremento en la velocidad de transcripción de los genes correspondientes.

La subsiguiente traducción de estos mRNAs daría lugar a la aparición de polipéptidos sólo detectables luego del tratamiento.

Por otro lado, si el control se produjera a nivel de la traducción, no serían esperables cambios en la concentración de los mRNAs específicos luego del agregado del inhibidor.

Los experimentos descriptos en esta sección sirvieron para demostrar que el efecto de la cicloheximida sobre estos genes es producir un aumento en la velocidad de transcripción de los mismos.

El estudio se llevó a cabo en primer lugar analizando los perfiles de proteínas que se obtienen por traducción *in vitro* de los RNA polyA+ extraídos de micelio no tratados o tratados por 6 horas con 2 µM cicloheximida. El análisis se llevó a cabo por PAGE-SDS en las condiciones descriptas en Materiales y Métodos.

Se observa una gran diferencia en el número e intensidad de las bandas correspondientes a ambas situaciones (Figura 9), comprobándose la aparición de al menos dos nuevos polipéptidos de 27 kD y 99 kD (marcados con flechas),

verificándose que estos tamaños son idénticos a los tamaños de las proteínas de 27 kD y 99 kD obtenidas por marcación *in vivo*, tal como se describió en las secciones anteriores.

Las diferencias observadas entre los productos de traducción *in vitro* de los mRNAs correspondientes a cada condición, indicarían que la cicloheximida sería capaz de producir una alteración rápida y significativa a nivel de la transcripción, posiblemente a través de determinados factores regulatorios que "disparan" la síntesis de ciertos mRNAs inducibles o que afectan el recambio de algún represor.

No se pudieron observar, sin embargo, bandas de 31 kD o 70 kD correspondientes a las proteínas inducibles antes mencionadas. No obstante, G.O. Aisemberg (Aisemberg *et al*, 1988) demostró que el transcripto correspondiente a la proteína de 70 kD se encuentra presente a las 6 horas luego del tratamiento, y es capaz de traducirse *in vitro*, lo cual hace pensar que la ausencia de estos polipéptidos en el carril correspondiente al estado inducido puede deberse a una menor eficiencia de traducción de estos mRNAs en el sistema de traducción heterólogo con respecto a otros.

Se llevó a cabo un análisis densitométrico de la autofluorografía correspondiente a la Figura 9 (Figura 10). En el mismo se demuestra que tanto *in vivo* como *in vitro* existen diferencias notables entre los estados tratados y no tratados con el inhibidor.

Esta fue la primera evidencia que indicó que el efecto de la cicloheximida sobre la inducción de los polipéptidos de 27 kD y 99 kD sería a nivel de un aumento de la transcripción de los genes correspondientes a dichas proteínas.

Un resultado similar se hubiera obtenido si la acumulación de determinados RNA mensajeros se debiera a la inhibición selectiva de la degradación de los mismos.

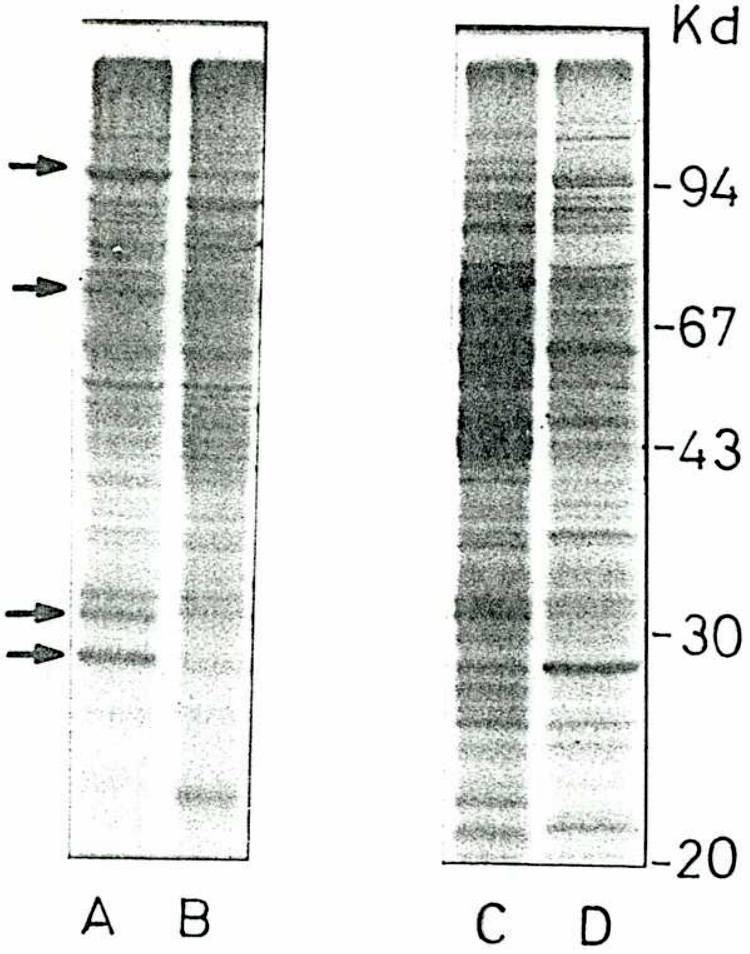


Figura 9: Polipéptidos obtenidos por marcación *in vivo* o por traducción *in vitro*

12% PAGE-SDS de proteínas marcadas con L-^{35}S metionina (≈2.10^{6} cpm por carril). A) y B) marcación *in vivo*, C) y D) traducción *in vitro* de RNA polyA^{+}.
A) y C) corresponden a micelios tratados por 6 hs con ciclohexímida, B) y D) corresponden a micelios sin tratamiento.

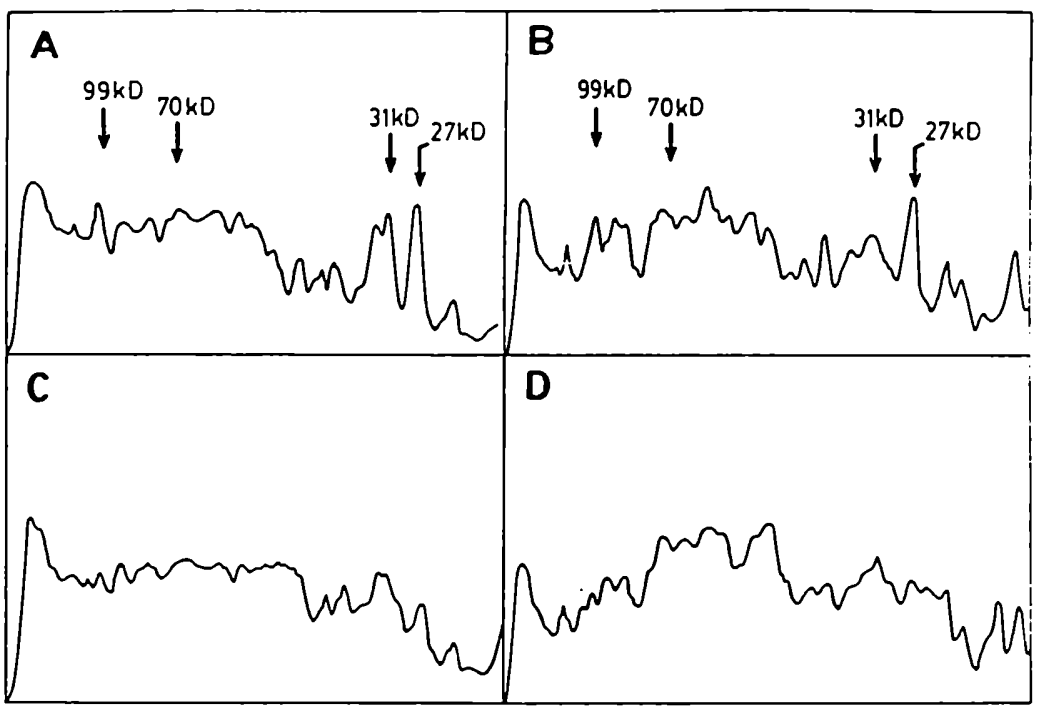


Figura 10: Análisis densitométrico de las autofluorografías

Se analizaron por densitometría las autofluorografías correspondientes a la Figura 9. A) y C) corresponden a los perfiles polipeptídicos obtenidos por marcación *in vivo* con L-^{35}S metionina de
(A) cultivos tratados por 6 horas con cicloheximida, (C) sin tratar. (B) y (D) corresponden a los perfiles polipeptídicos obtenidos de traducir *in vitro* un RNA obtenido de cultivos, (B) sin tratar, (D) 6 h con cicloheximida.
Las flechas indican la posición de los polipéptidos descriptos como inducibles por el tratamiento, comparables en las figuras A y C, al igual que B y D que están alineadas entre sí.

Tampoco podría descartarse que la diferencia observada en los patrones polipeptídicos obtenidos de la traducción *in vitro* de los mRNA correspondientes a ambas condiciones se deba a alguna modificación promovida por la cicloheximida que altere la capacidad de los mismos de ser traducidos tanto *in vivo* como *in vitro*.

A partir de estas evidencias, se decidió encarar el análisis de los mRNAs que se acumulan luego del tratamiento. Esto se llevó a cabo utilizando sondas diferenciales de [^{32}P] cDNA (ver Materiales y Métodos) como fue descripto previamente (Aisemberg *et al*, 1987).

La sonda diferencial se preparó a partir de [^{32}P] cDNA proveniente de la transcripción reversa de RNA polyA+ extraído de micelio tratado con cicloheximida. Una vez eliminado el molde de RNA, el cDNA radioactivo (simple cadena) fue hibridado con un gran exceso de RNA total extraído de micelios no tratados con cicloheximida.

Se provocó así la formación de heteroduplex [^{32}P] cDNA-RNA en todas las secuencias de [^{32}P] cDNA que fueran complementarias a mRNAs anteriores al agregado de cicloheximida, quedando como simple cadena las secuencias de [^{32}P] cDNA complementarias a mRNAs sintetizadas *de novo* luego de agregar el inhibidor.

En *Northern blots* de RNA extraído de micelios tratados con cicloheximida, estas sondas de cDNA enriquecido reconocerán solamente los transcriptos inducidos.

Dado que los fragmentos de [^{32}P] cDNA tuvieron una longitud promedio de 0,5 kb y el RNA polyA+ unas 2-3 kb (Aisemberg, 1987), se pudo estimar que el exceso molar de RNA del estado no tratado usado para la competencia era de aproximadamente 100 veces.

Aquí se empleó una cantidad de RNA proveniente de micelios no tratados 10 veces mayor que la descripta por Aisemberg, dado que en micelios tratados por 24 y/o 48 horas con cicloheximida existe una desaparición casi total de los mRNAs previos al agregado del inhibidor (Aisemberg, 1987), efecto que no sería idéntico a las 6 horas de tratamiento, tal como se observó en los patrones polipeptídicos obtenidos por traducción *in vitro* de RNA polyA+ (Figura 9).

La concentración óptima necesaria para una competencia casi total se ensayó combinando con 100, 200 y 500 veces de exceso en masa de RNA polyA+ extraído de micelios no tratados, las sondas de [^{32}P] cDNA e hibridando *Northern blots* de ambas condiciones.

En la Figura 11 se observa el resultado de utilizar una sonda de [^{32}P] cDNA (competida con un exceso de 500 veces en masa de RNA polyA+) para hibridar *Northern blots* con 5 µg de RNA polyA+ extraído de micelios tratados o no tratados con el inhibidor.

Se observan al menos 4 bandas en la población de RNA inducido de aproximadamente 1100, 2300, 3700 y 4100 nucleótidos que están ausentes previo al tratamiento (marcados con flechas en la Figura 11).

La banda de mRNA de alrededor de 2300 nucleótidos podría corresponder al transcripto codificante para la proteína de 70 kD (Aisemberg *et al*, 1988).

La competencia del [^{32}P] cDNA con el RNA no es total, ya que se observan bandas en el carril 1 que corresponden a mRNAs presentes previo al tratamiento.

Este resultado indicaría que efectivamente la cicloheximida es capaz de producir la acumulación de un número discreto de transcriptos en micelios de *Neurospora crassa*, luego de un corto tiempo en presencia del inhibidor.

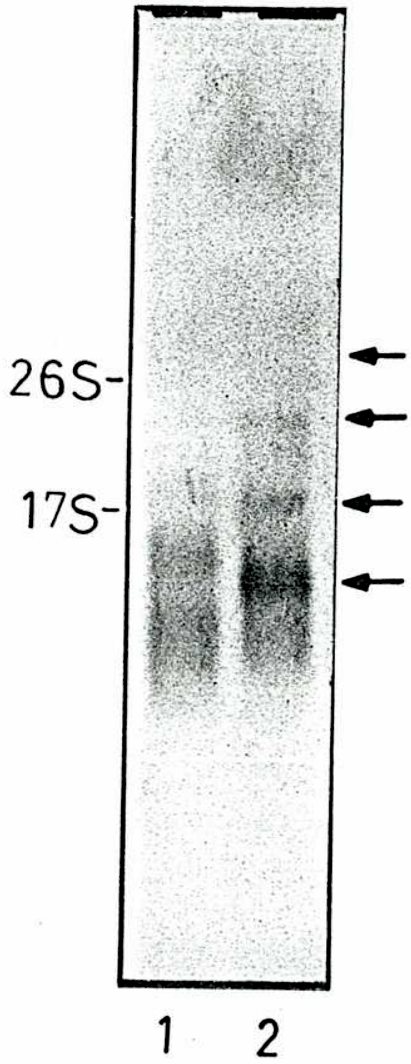


Figura 11: Transcripción diferencial inducida por ciclo-heximida

Northern blot de RNA polyA+ (5 µg por carril) hibridado con la sonda diferencial de 6 horas. 1) micelio sin tratar, 2) micelio tratado por 6 horas con cicloheximida.
Exposición de 48 horas a -70°C con pantalla intensificadora.

5.5. CLONADO DE GENES INDUCIBLES POR CICLOHEXIMIDA

Habiendo demostrado la existencia de un número reducido de transcriptos inducibles por cicloheximida, se decidió encarar el clonado molecular de los genes correspondientes a las proteínas de 27 kD y 31 kD. Se utilizó para ello una genoteca de fragmentos EcoRI de DNA de *Neurospora crassa* insertados en el bacteriófago λL47.1, tal cual se describió en Materiales y Métodos.

Ocho a diez equivalentes genómicos (80000 pfu) fueron plaqueados en 4 cajas de Petri y de cada uno se sacó 3 filtros de nitrocelulosa, tal cual fue descripto en Materiales y Métodos.

Uno de estos filtros fue hibridado con el plásmido pGem 2-30A (Aisemberg *et al*, 1988) que contiene al gen de la proteína inducible de 70 kD; otro fue hibridado con una sonda de [^{32}P]cDNA obtenida a partir de RNA extraído de micelios no tratados, y la tercera fue analizada con una sonda de [^{32}P]cDNA diferencial competida con 500 veces en masa de RNA polyA$^+$, como se describió antes. El plásmido pGem2-30A reveló un número de positivos razonable para un gen que se encuentra representado una sola vez por genoma haploide (Aisemberg *et al*, 1988).

Se tomaron como positivos aquellos clones que no hibridaron con la sonda de [^{32}P]cDNA específica para secuencias inducibles (sonda competida). Se aislaron de esta manera 30 clones positivos que fueron reexaminados a baja densidad de plaqueo y se reaislaron.

Los clones confirmados de esta manera fueron amplificados.

5.6. CARACTERIZACION DE LOS GENES CLONADOS

Para confirmar que los clones aislados codifican para los polipéptidos inducibles de 27 kD y 31 kD, en primer lugar debía verificarse que los mismos hibridaran con secuencias de mRNA inducibles.

Para ello se marcó DNA de los fagos λ recombinantes por el método de *nick translation* (ver Materiales y Métodos) y se hibridaron filtros obtenidos por *Northern blot* conteniendo 5 µg por carril de RNA polyA⁺ inducido o no inducido, con cada uno de los 5 clones aislados. Dos de ellos no hibridaron con secuencia alguna y los 3 restantes lo hicieron con mRNAs de idéntico tamaño. La hibridación de 2 de ellos (diferentes por mapeo de restricción), que se llamaron E11BB y E29BB, se muestra en la Figura 12. Se observa que la hibridación ocurre exclusivamente en el carril de los mRNAs inducidos.

Para determinar si estos clones que codifican para secuencias inducibles correspondían a las proteínas de 27 kD y 31 kD, se seleccionaron los mRNAs específicos por hibridación-selección, tal cual se describió en Materiales y Métodos y se tradujeron en un sistema de reticulocitos de conejo.

Los productos de la traducción *in vitro* fueron analizados por PAGE-SDS (Figura 13).

El análisis demostró que el RNA seleccionado con el clon E11BB da un producto de traducción de 27 kD, mientras que el E29BB codifica para una proteína de 31 kD. Obsérvese la ausencia de dichas bandas en los productos endógenos de síntesis del sistema de traducción *in vitro* (Figura 13, carril C).

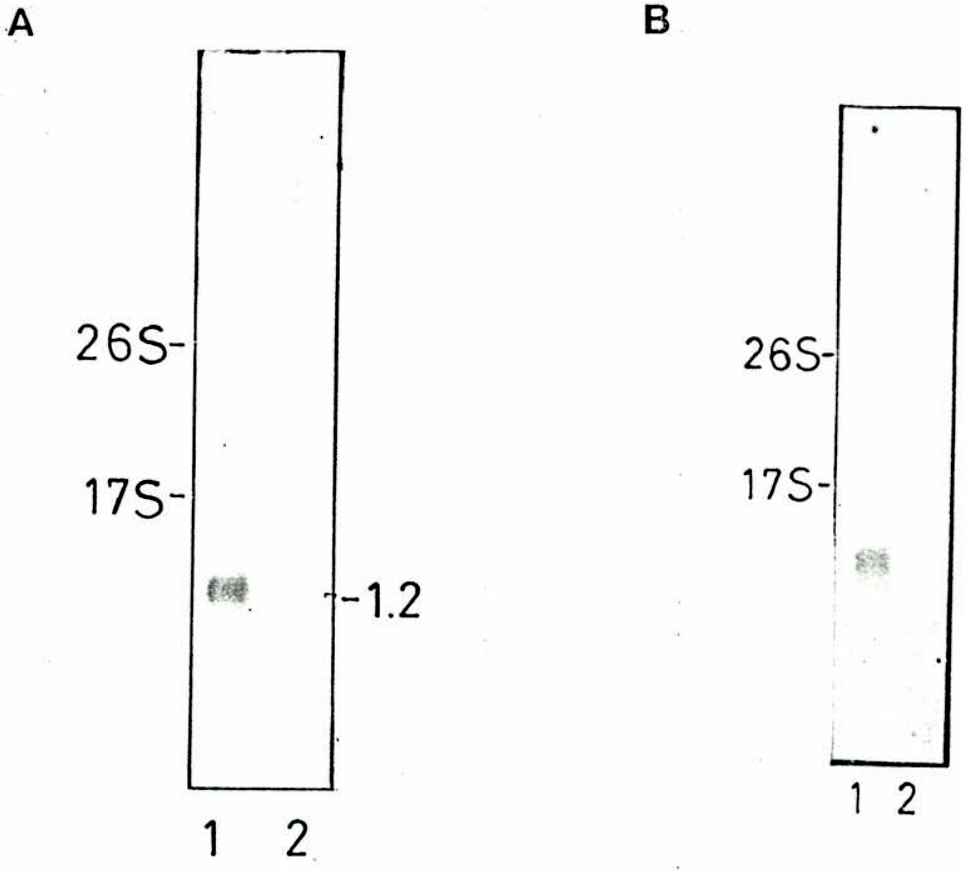


Figura 12: mRNA reconocidos por los clones E11BB y E29BB

Northern blots de RNA polyA+ (5 µg por carril) hibridados con los clones A) E11BB o B) E29BB marcados por *nick translation*.
1) RNA de micelio tratado por 6 hs con 2 µM cicloheximida.
2) RNA de micelio sin tratamiento.
Exposición de 24 horas a -70°C con pantalla intensificadora.

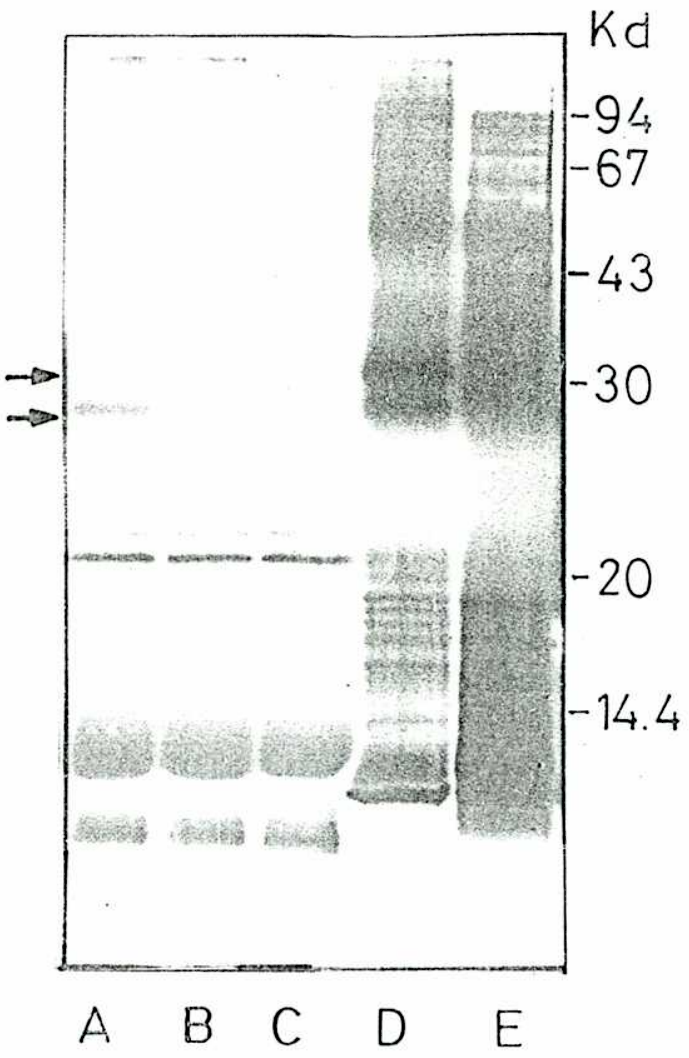


Figura 13: Productos de traducción *in vitro* de mRNAs seleccionados por hibridación-selección

12% PAGE-SDS de proteínas marcadas con L-^{35}S metionina (D) y E) aproximadamente 10^5 cpm, A), B), C) no cuantificables) Productos de traducción *in vitro* de los mRNAs seleccionados con DNA de los clones A) E11BB, B) E29BB, C) control sin RNA, D) y E) extractos de micelio marcados *in vivo* con L-^{35}S metionina, D) tratado con 2 µM cicloheximida por 6 horas, o E) sin tratar.
Exposición de 30 días.

Cada clon hibridaría con una sola especie de mRNA (Figura 12) y éstos a su vez darían productos de traducción únicos que coinciden en tamaño con los polipéptidos marcados *in vivo* de 27 kD y 31 kD (Figura 13).

Se han clonado, por lo tanto, los genes correspondientes a las proteínas de 27 kD y 31 kD y se denominarán gen E11 (proteína de 27 kD) o gen E29 (proteína de 31 kD).

5.7. MAPEO DE RESTRICCION Y LOCALIZACION DE LOS GENES INDUCIBLES EN LOS CLONES E11BB Y E29BB

Se determinó el mapa de restricción del clon E29BB utilizando combinaciones de 5 enzimas de restricción ya sea a través de digestiones simples o dobles, y separación en geles de agarosa (Figura 14).

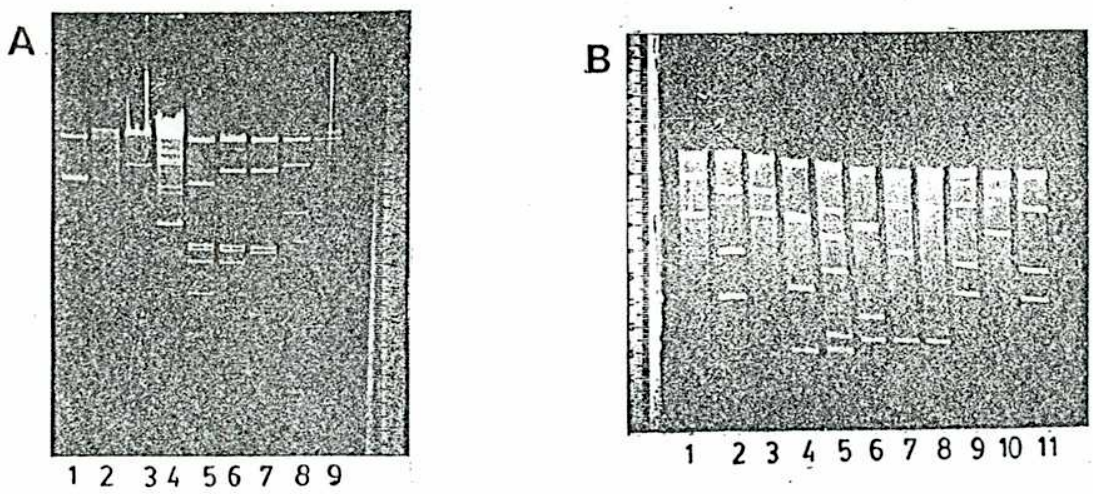
El gel se transfirió y se hibridó con una sonda de [^{32}P] cDNA obtenida a partir de RNA inducido (6 horas con cicloheximida), en la forma descripta en Materiales y Métodos. Se encontró que el fragmento de 2,1 kpb obtenido por la doble digestión con EcoRI-HindIII hibridó con dicha sonda. Teniendo en cuenta que no se verificó hibridación con ningún otro fragmento obtenido de dicha restricción, se concluye que al menos la secuencia complementaria a la región 3´ del mRNA se encuentra en dicho fragmento, sin poder especificar la orientación o la localización exacta de los genes (resultados no mostrados).

El mismo análisis se llevó a cabo con el clon E11 (Figura 15) y se obtuvo hibridación de un fragmento HindIII de 2,0 kpb (Figura 14).

Como en el otro caso, la región 3´ se encontraría en dicho fragmento, dado que el [^{32}P] cDNA utilizado como sonda fue sintetizado a partir de oligo dT que se aparea con el polyA+ del extremo 3´ de los mRNAs.

Sin embargo, dado que los [^{32}P] cDNA sintetizados superan los 500 nucleótidos de longitud y que los mRNA correspondientes a los genes E11 y E29 tienen como máximo 1,2 kb, no es descartable que también el extremo 5´ se encuentre dentro de los fragmentos mencionados. En el caso de E11, experimentos posteriores confirmaron esta hipótesis.

Se decidió por lo tanto, subclonar estos fragmentos de restricción en el plásmido pGem-1 (Promega Biotec), que tiene alto número de copias, codifica para resistencia a ampicilina y, además, posee en ambas orientaciones promotores para la T7-RNA polimerasa y la SP6-RNA polimerasa flanqueando los sitios de clonado. Estos promotores pueden utilizarse para la síntesis de ribosondas.



C

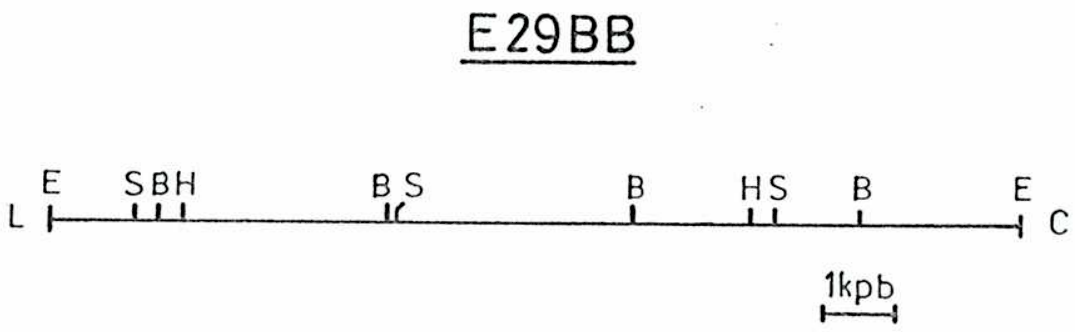
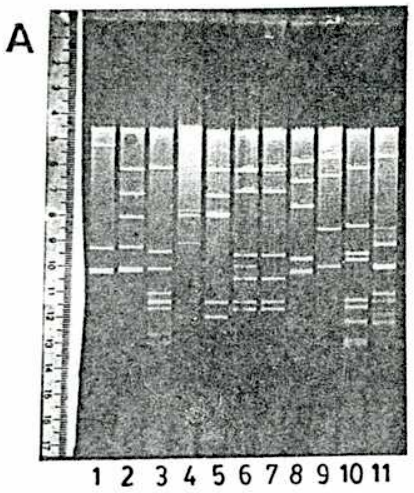


Figura 14: Mapa de restricción del clon E29BB

A) y B) Electroforesis en geles de 1% agarosa de DNA del clon E29BB cortado con:
A): EcoRI+HindIII, 2) EcoRI+XhoI, 3) XhoI, 5) BamHI+EcoRI, 6) BamHI, 7) SalI+BamHI, 8) SalI, y 9) HindIII+SalI.
B): 1) EcoRI, 2) HindIII+SalI, 3) HindIII, 4) EcoRI+HindIII, 6) EcoRI+XhoI, 7) XhoI+HindIII, 8) XhoI, 9) XhoI+SalI, 10) EcoRI+SalI, y 11) SalI. El carril 5) corresponde a DNA del fago λ cortado con HindIII, empleado como marcador.
C): Mapa de restricción deducido a partir de las movilidades en los geles de agarosa.
Abreviaturas: E: EcoRI, B: BamHI, S: SalI, H: HindIII, L: brazo mayor de fago λ, C: brazo menor de fago λ.



B

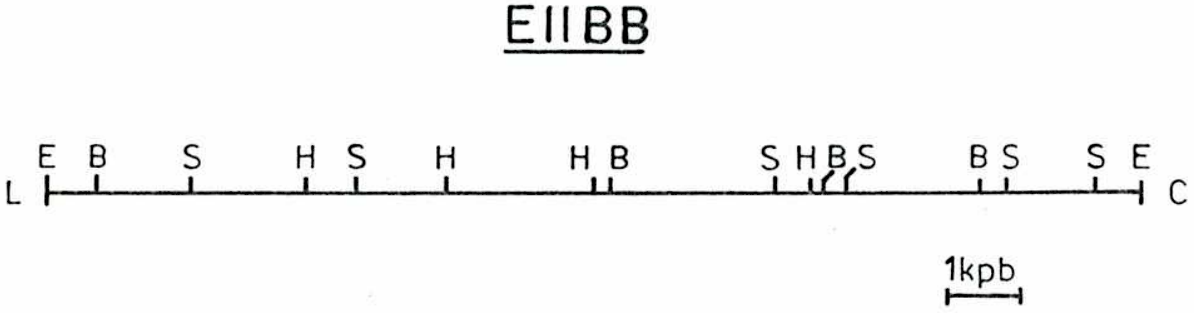


Figura 15: Mapa de restricción del clon E11BB

A) Electroforesis en gel de 1% agarosa del DNA del clon E11BB cortado con:
1) HindIII, 2) HindIII+EcoRI, 3) SalI+HindIII, 4) XhoI, 5) EcoRI+XhoI, 6) EcoRI+SalI, 7) SalI, 9) BamHI, 10) SalI+ BamHI, y 11) BamHI+XhoI. El carril 8) corresponde a DNA del fago λ cortado con HindIII, usado como marcador.
B): Mapa de restricción deducido a partir de las movilidades en el gel.
Abreviaturas: E: EcoRI, B: BamHI, S: SalI, H: HindIII, L: brazo mayor de fago λ, C: brazo menor de fago λ.

5.8. MAPEO DE RESTRICCION DE LOS SUBCLONES

Los subclones correspondientes a los fragmentos que hibridan con [^{32}P] cDNA obtenido de RNA inducido fueron llamados: E11BBHH16 el que contiene el inserto HindIII-HindIII de 2,0 kpb de E11BB, y E29BBEH17 el que tiene el inserto EcoRI-HindIII de 2,1 kpb de E29BB.

Asimismo, el fragmento HindIII-HindIII de 2,0 kpb de E11BB fue subclonado en la orientación inversa en el mismo vector (E11BBHH19).

Se mapearon los subclones E29BBEH17 (Figura 16) y E11BBHH16 (Figura 17) cortando con varias combinaciones de enzimas de restricción en las condiciones descriptas.

Se obtuvieron también subclones correspondientes a otras regiones de E11BB y E29BB, tal como se indica en la Tabla II y en la Figura 18.

Se verificó asimismo por hibridación de *Northern blots* de RNA total con los subclones marcados con ^{32}P por iniciación al azar con oligonucleótidos de múltiples secuencias (ver Materiales y Métodos) que ambos (E11BBHH16 y E29BBEH17) reconocían en forma mayoritaria mRNAs de tamaños casi idénticos entre sí que, a su vez, correspondían a los transcriptos reconocidos por los clones originales en fago λ (Figura 19).

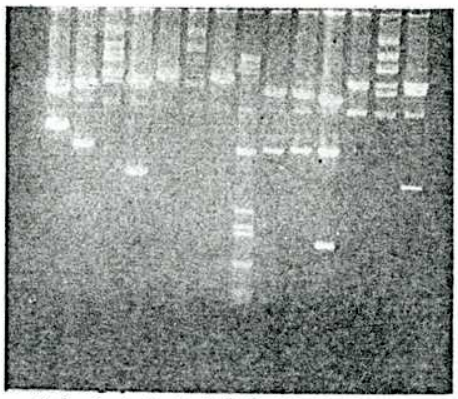
Se observa además, que los genes presentes en estos clones no se expresarían en el estado previo al tratamiento con el inhibidor.

Asimismo puede verse que ambos clones hibridan con algunos mRNAs de tamaños considerablemente mayores.

Nombre	Fragmento	Hibridación c/Northern	Observaciones
E11BBHH16	HindIII-HindIII 2,0 kpb	+	
E11BBHH19	HindIII-HindIII 2,0 kpb	+	orientación inversa a E11BBHH16
E11BBHH23	HindIII-HindIII 3,0 kpb		
E29BBHH17	EcoRI-HindIII 2,1 kpb	+	
E29BBHH53	HindIII-HindIII 7,5 kpb		
E29BBHE3	HindIII-EcoRI 3,8 kpb		

Tabla II. Características de los subclones obtenidos en pGem-1 a partir de los clones en λ L47,1 E11BB y E29BB.

A



B

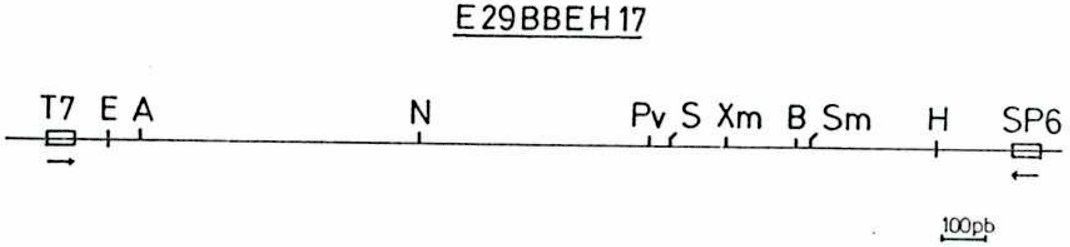
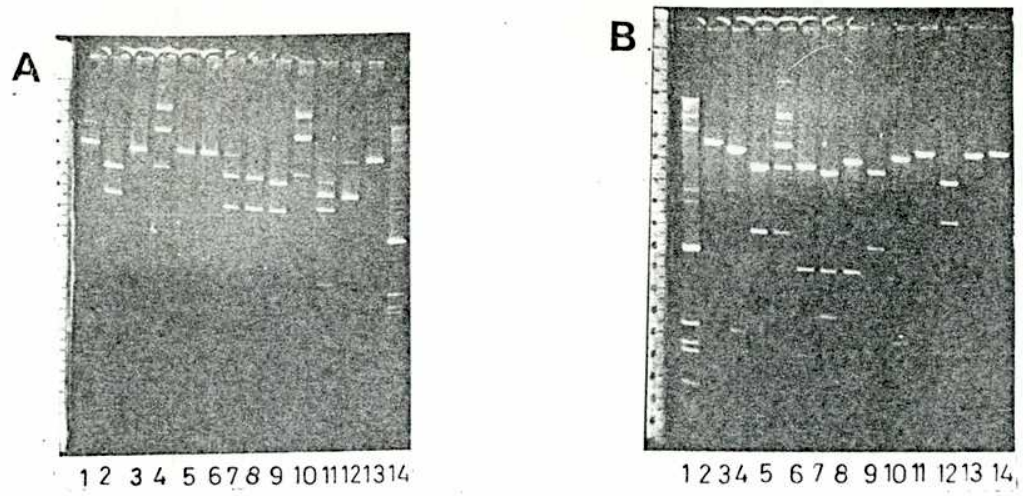


Figura 16: Mapa de restricción del clon E29BBEH17

A): Electroforesis en gel de 1,5% agarosa del DNA del clon E29BBEH17 cortado con:
1) BamHI+EcoRI, 2) HindIII+NcOI, 3) NcoI, 4) BamHI+NcoI, 5) HindIII+NruI, 6) NruI, 7) BamHI+NruI, 9) EcoRI+PvuII, 10) PvuII, 11) BamHI+PvuII, 12) SphI+EcoRI, 13) SphI, 14) SphI+ BamHI. El carril 8) corresponde al plásmido pGem-1 cortado con HinfI y a DNA de λ cortado con HindIII, usados como marcadores.
B): Mapa de restricción deducido a partir de las movilidades en el gel de agarosa.
Abreviaturas: E: EcoRI, A: AvaI, N: NcoI, Pv: PvuI, S: SalI, Xm: XmnI, B: BamHI, Sm: SmaI.



C

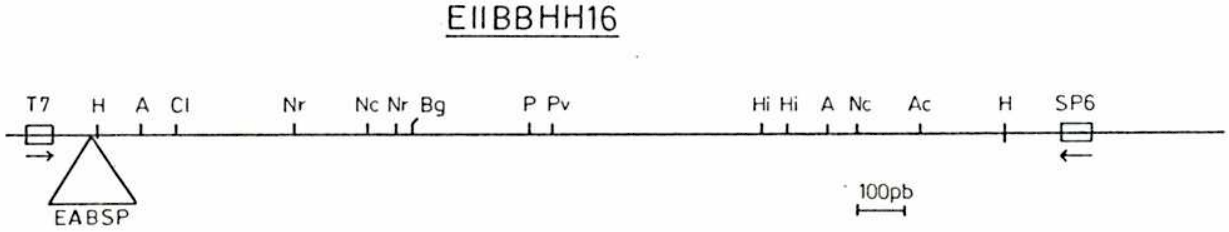


Figura 17: Mapa de restricción del clon E11BBHH16

A) y B) Electroforesis en geles de 1,5% agarosa del DNA de los clones E11BBHH16 o E11BBHH19 cortados con distintas enzimas de restricción.
A): E11BBHH16 cortado con: 1) NsiI, 2) NsiI+BamHI, 4) BclI, 5) BclI+BamHI, 7) AccI, 8) AccI+BamHI, 10) SphI, 11) SphI+BamHI, o E11BBHH19 cortado con 3) NsiI+BamHI, 6) BclI+BamHI, 9) AccI+BamHI, 12) SphI+BamHI, 13) PvuI. El carril 14) corresponde al plásmido pGem-1 cortado con HinfI y a DNA de λ cortado con HindIII usados como marcadores.
B): E11BBHH16 cortado con: 2) PvuI, 4) BamHI e HincII, 5) HincII, 7) NcoI+BamHI, 8) NcoI, 10) NruI+BamHI, 11)NruI, 13) ClaI+BamHI, 14) ClaI o E11BBHH19 cortado con: 3) HincII+BamHI, 6) NcoI+BamHI, 9) NruI+BamHI, 12) ClaI+BamHI. El carril 1) corresponde a DNA del plásmido pGem-1 cortado con HinfI y DNA de fago λ cortado con HindIII usados como marcadores.
C): Mapa de restricción deducido a partir de las movilidades en los geles de agarosa.
Abreviaturas: H: HindIII; A: AvaI; Cl: ClaI; Nr: NruI; Nc: NcoI; Bg: BglII; P: PstI; Pv: PvuII; Hi: HincII; Ac: AccI.

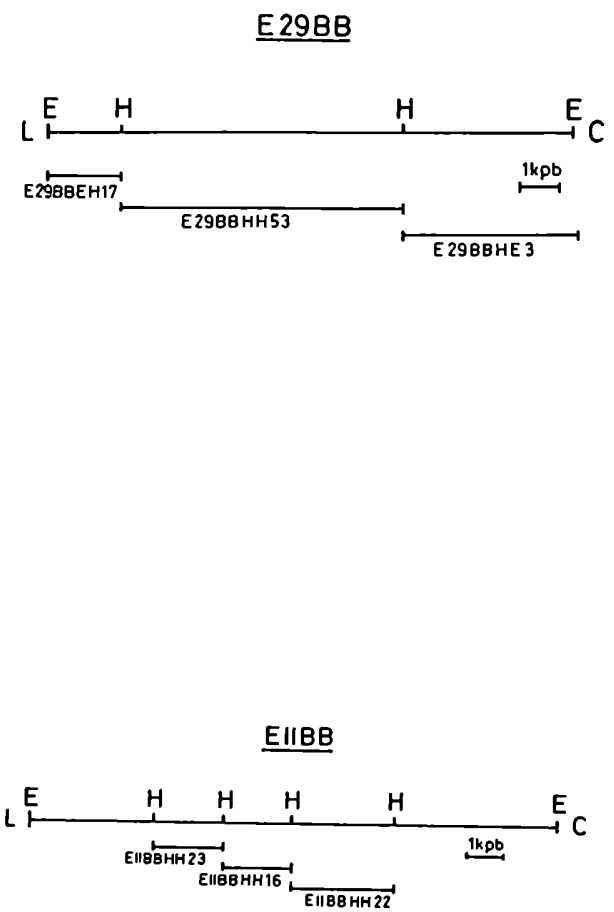


Figura 18: Localización de los distintos fragmentos subclonados en pGem

A) Provenientes del clon E29BB
B) Provenientes del clon E11BB

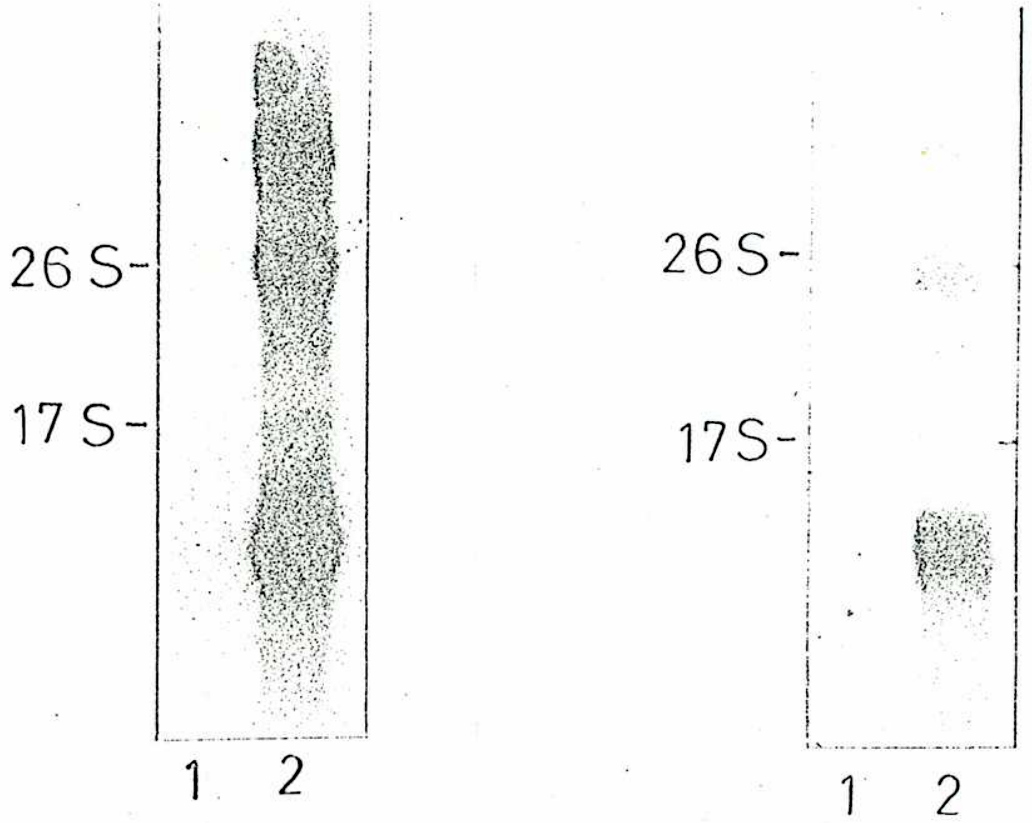


Figura 19: mRNA reconocidos por los clones E11BBHH16 y E29BBEH17

Northern blot idénticos de RNA polyA+ (5 µg por carril) hibridados con los clones A) E11BBHH16, B) E29BBEH17 marcados por "iniciación al azar". Los carriles 1) micelio no tratado, y 2) tratados por 6 horas con 2 µM cicloheximida. Exposición de 2 días a -70°C con pantalla intensificadora.

La intensidad de la hibridación con estas especies varía de transferencia en transferencia, incluso utilizando mRNAs obtenidos en la misma purificación, lo que hace pensar en que las mismas podían originarse de algún artificio en la desnaturalización de los RNAs previo a la corrida electroforética.

5.9. ALELOS UNICOS CODIFICARIAN PARA LOS GENES CLONADOS

Se analizaron *Southern blots* de DNA genómico de *Neurospora crassa* cortados con EcoRI, HindIII o ambas enzimas a la vez en las condiciones descriptas en Materiales y Métodos para 100% de homología y se hibridaron con E29BBEH17 (Figura 20) y E11BBHH16 (Figura 21), marcados por iniciación al azar con ^{32}P.

Se observa que ambos clones hibridan con fragmentos de restricción únicos correspondientes a los tamaños esperados de los mapas de restricción (Sección 5.7).

(Se comprobó que la banda de aproximadamente 3 kpb presente en los carriles B y C de la Figura 21 corresponde a una contaminación de la enzima HindIII con el plásmido pGem-1 de 2865 pb).

Si bien de estos resultados no se puede concluir que los genes clonados estén codificados por alelos únicos, parece muy poco probable que así no fuera, ya que en caso de existir dos o más alelos para dichos genes, sería muy raro encontrar fragmentos de restricción únicos para las varias enzimas, tal que los fragmentos generados por las mismas coincidan en tamaño con lo previsto por el mapeo de los clones.

Por las mismas razones antes mencionadas, sería muy poco probable que existiera más de una copia de dichos genes por genoma haploide con secuencias flanqueantes idénticas. Queda, sin embargo, la posibilidad de que se encuentren en el genoma de *Neurospora crassa* dos o más copias de estos genes, organizados en tandem, originados por ejemplo, por duplicaciones sucesivas. Para probar ésto, habría que comparar la señal de un fragmento que contenga un gen de copia única hibridado en un *blot* idéntico con una sonda comparable.

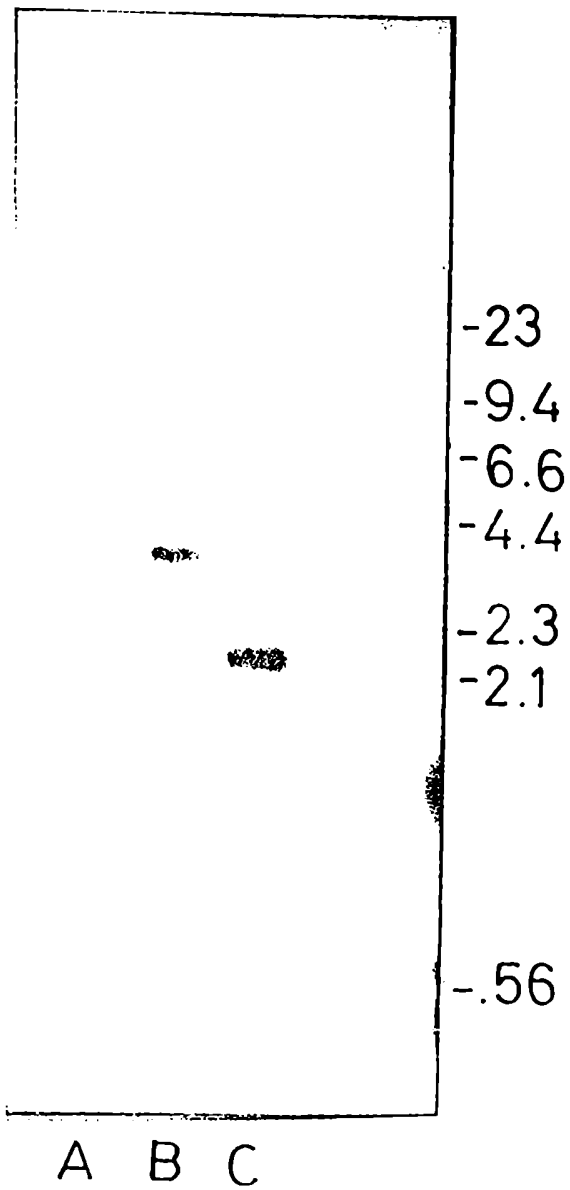


Figura 20: Número de copias del gen E29

Southern blot de DNA genómico de *Neurospora crassa* (10 µg por carril) cortado con A) EcoRI, B) HindIII o C) EcoRI+ HindIII e hibridado con E29BBEH17 marcado por "iniciación al azar". Los números a la derecha indican el tamaño en kpb. Exposición de 36 horas a -70°C con pantalla intensificadora.

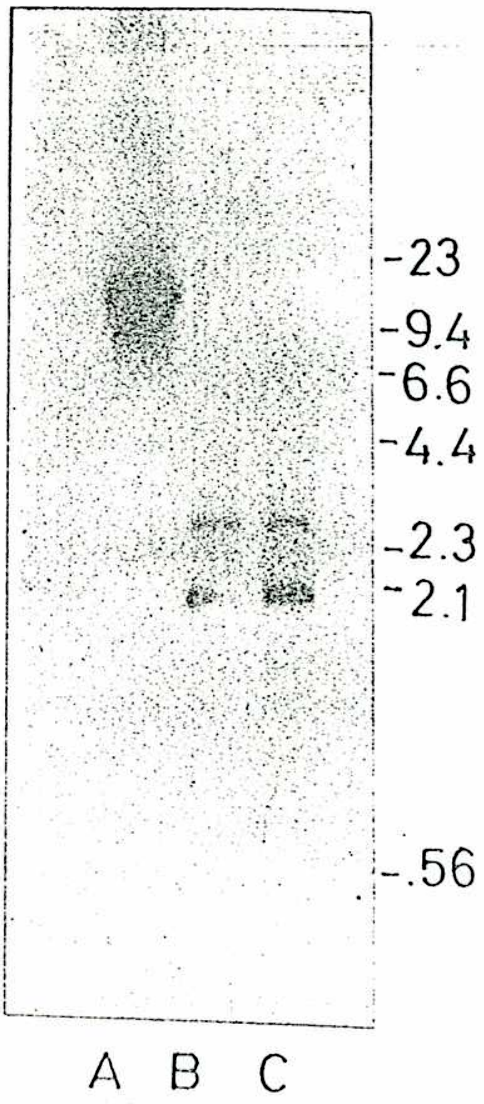


Figura 21: Número de copias del gen E11

Southern blot de DNA genómico de *Neurospora crassa* (10 µg por carril) cortado con A) EcoRI, B) HindIII o C) EcoRI+ HindIII e hibridado con E11BBHH16 marcado por "iniciación al azar". Los números a la derecha indican el tamaño en kpb. Exposición de 36 horas a -70°C con pantalla intensificadora.

Se ha descripto la existencia de homología del gen que codifica para la proteína de 70 kD con secuencias de *S. cerevisiae*, *E. coli* y algunos eucariotes superiores (Aisemberg *et al*, 1988).

Para analizar si sucedía otro tanto con el gen E11 se hibridó un *Southern blot* conteniendo DNA de *N. crassa*, *E. coli*, *S. cerevisiae*, *Tritricum aestivum* (trigo) y humano con la banda HindIII-HindIII del clon E11BBHH16, marcada con ^{32}P, en condiciones de 65% de homología, y se revelaron secuencias homólogas en *E. coli* y *S. cerevisiae* (resultados no mostrados), lo cual indicaría una conservación evolutiva de alguna zona del clon E11BBHH16 con secuencias de los mencionados organismos tal como ocurre para la otra secuencia inducible previamente descripta.

5.10. ANALISIS DE LA UNIDAD TRANSCRIPCIONAL DEL GEN E11

5.10.1. Localización y polaridad del gen E11

De los experimentos descriptos en las secciones anteriores, se desprende que las secuencias codificantes para el extremo 3´ del RNA mensajero de E11 están presentes en el fragmento de 2 kpb correspondiente al subclon E11BBHH16.

Sin embargo, nada puede decirse de la localización del extremo 5´. Para descartar la posibilidad de que el gen se extienda más allá de los sitios HindIII (Figura 15), se hibridaron *Northern blots* de RNA proveniente de micelios inducidos con sondas correspondientes a los subclones E11BBHH23 y E11BBHH22 (Ver Tabla II y Figura 18), que corresponden a las secuencias flanqueantes del subclon E11BBHH16 y se comprobó que en ninguno de los dos casos había hibridación con el mRNA en cuestión (resultados no mostrados).

Esto indica que todo el gen E11 se encuentra comprendido dentro del subclon E11BBHH16.

Para comprobar la polaridad del gen, se procedió a mapear el mismo por hibridación del mRNA con una ribosonda obtenida del clon genómico y posterior degradación de las secuencias simple cadena con nucleasa S1.

El análisis se llevó a cabo tal como se indica en Materiales y Métodos, utilizando una ribosonda uniformemente marcada con ^{32}P sintetizada a partir del promotor de SP6-RNA polimerasa, ya sea de E11BBHH16 o E11BBHH19 linealizados con EcoRI (Ver Tabla II y Figura 18). En ambos casos, la sonda obtenida comprende la totalidad del subclon de 2,0 kpb y se utilizó como templado una u otra cadena del inserto (Ver Figura 22).

La hibridación se llevó a cabo a 65°C por 4 horas con 50 µg de RNA total proveniente de micelios tratados por 6 horas con cicloheximida. La digestión con nucleasa S1 se llevó a cabo en las condiciones descriptas (Ver Materiales y Métodos).

Se analizaron los productos por PAGE desnaturalizante y se encontraron bandas "protegidas" con la ribosonda correspondiente a E11BBHH16, pero no con la ribosonda complementaria (correspondiente a E11BBHH19).

Esto permite determinar la polaridad del gen en el subclon, como se muestra en la Figura 23 con la flecha superior.

Asimismo, el experimento indicaría la existencia de al menos 2 secuencias, posiblemente intrones, presentes en la ribosonda del clon genómico, pero ausentes en el mRNA lo que da un fragmento de protección de un tamaño aproximado de 900 nucleótidos, otro de 160-170 nucleótidos y un tercero de 50-55 nucleótidos.

La suma de estas secuencias protegidas daría un tamaño similar al esperado para el transcripto del gen E11 estimado en 1,2 kb por electroforesis en geles de agarosa desnaturalizantes (Sección 5.6). Se observan dos bandas de menor intensidad, que pueden atribuirse a una degradación deficiente o a la existencia de un mRNA con un procesamiento diferente (Figura 22).

5.10.2. Mapeo del extremo 3´ del gen E11

La determinación del extremo 3´ del gen E11 en el subclon E11BBHH16 se llevó a cabo utilizando ya sea un fragmento del inserto marcado en un extremo con ^{32}P o ribosondas uniformemente marcadas.

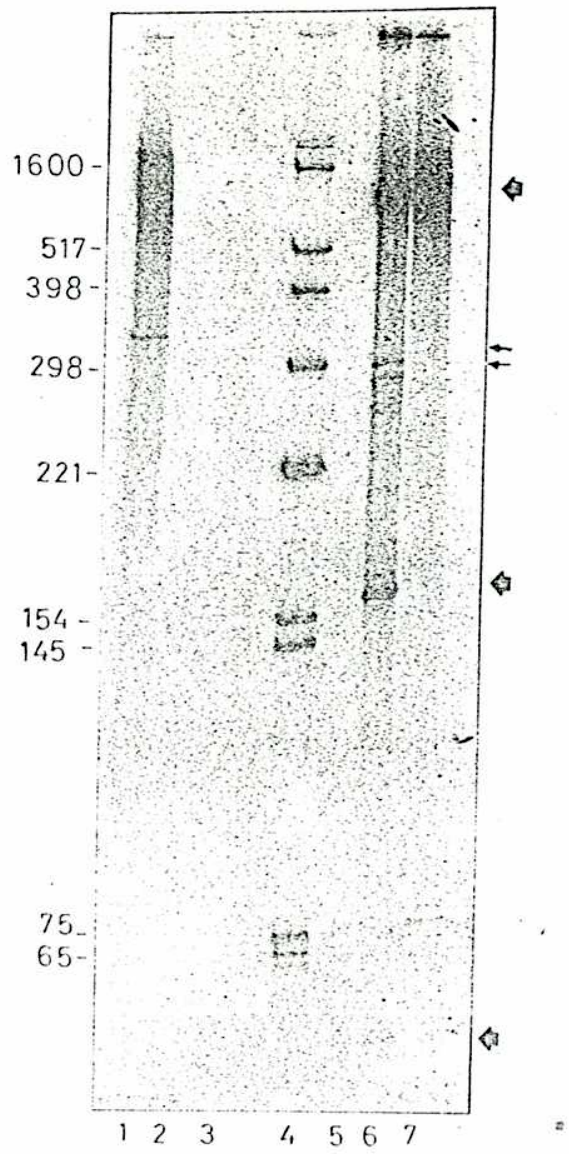


Figura 22: Polaridad del gen E11

8% PAGE denaturalizante correspondiente a los productos de protección a degradación con nucleasa S1, usando ribosondas correspondientes a E11BBHH16 (carriles 1) a 3) o a E11BBHH19 (carriles 5) a 7). Los carriles 1) y 7) corresponden a las sondas tal cual; los carriles 3) y 5) corresponden a la degradación de la sonda en ausencia de RNA; y los carriles 2) y 6) corresponden a los productos de protección obtenidos cuando se hibridó las sondas con 50 µg de RNA total extraído de micelios tratados por 6 horas con cicloheximida. Los números a la izquierda indican el tamaño de los marcadores en bases de DNA (carril 4).
Exposición de 18 horas a temperatura ambiente sin pantalla intensificadora.

En el primer caso, se marcó por *fill-in* (Ver Materiales y Métodos) los fragmentos AvaI del plásmido E11BBHH16 y se recortó con HindIII. Se extrajo de un gel nativo de poliacrilamida la banda de aproximadamente 400 pb, que se se hibridó con 50 µg de RNA total obtenido de micelios tratados con cicloheximida y se digirió con nucleasa S1 en las condiciones descriptas. Se corrió un gel desnaturalizante y se observó una banda protegida de aproximadamente 330 nucleótidos (resultados no mostrados).

Esto indica que el sitio AvaI se encuentra dentro de un exón, y que el mismo se extiende 330 nucleótidos hacia el extremo 3´ del mRNA. Este experimento, sin embargo, no permite descartar la existencia de otro exón en la zona 3´ del clon.

Para ello se sintetizaron ribosondas con SP6 RNA polimerasa, utilizando el plásmido E11BBHH16 linealizado con HincII, NcoI o AvaI, y se procedió a hibridar cada una de dichas sondas con 50 µg de RNA total en las condiciones ya descriptas.

Luego se digirió con nucleasa S1 y los productos de protección se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (Figura 23).

En la Figura 24 se esquematizan las sondas y las protecciones obtenidas.

Se concluye que el extremo 3´ debe situarse entre 224 y 244 nucleótidos corriente abajo del sitio NcoI y, dado que estas sondas se encuentran uniformemente marcadas y se extienden desde el extremo del clon hasta el sitio correspondiente en cada caso, se descarta la posibilidad de otro exón en el extremo 3´ del gen.

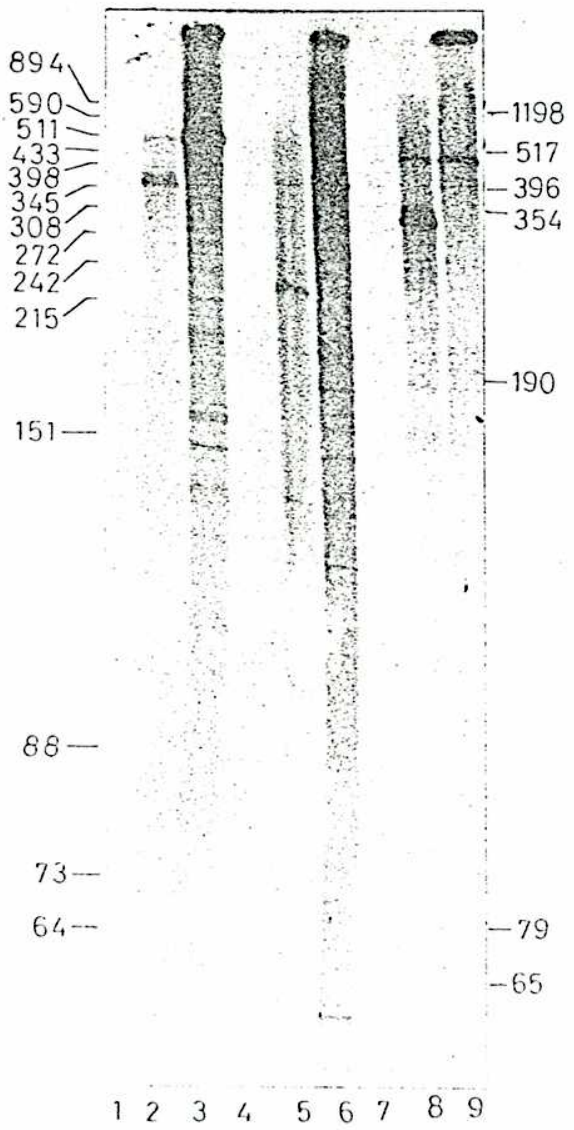


Figura 23: Mapeo del extremo 3' del mRNA del gen E11

8% PAGE denaturalizante correspondiente a los productos de protección a degradación con nucleasa S1. Las ribosondas fueron sintetizadas con SP6 usando E11BBHH16 como templado linealizado en los sitios HincII (carriles 1 a 3)), NcoI (carriles 4) a 6), o AvaI (carriles 7) a 9)). Los carriles 3), 6) y 9) corresponden a las sondas tal cual, los carriles 1), 4) y 7) a la degradación en ausencia de RNA y los carriles 2), 5) y 8) a los productos de protección. Los números a la derecha y a la izquierda indican tamaño de DNA en bases. Exposición de 24 horas a -70°C con pantalla intensificadora.

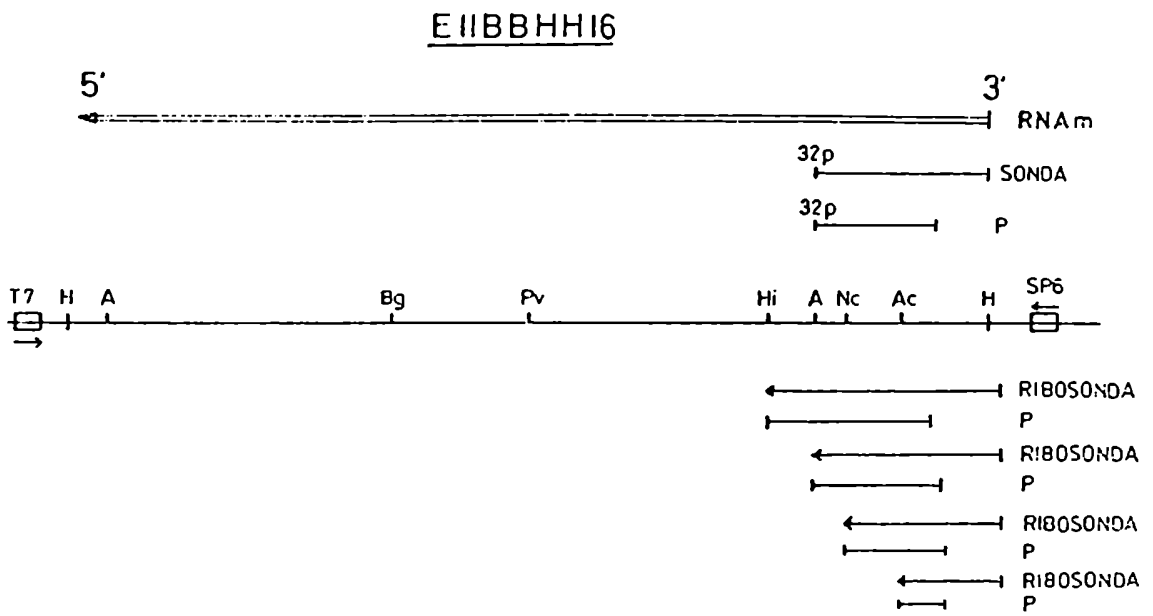


Figura 24: Mapeo del extremo 3' del gen E11

El extremo 3' y la polaridad del gen E11 fue determinado por mapeo de protección a la digestión con nucleasa S1. Arriba se indica la orientación del mRNA y abajo se indican las sondas utilizadas, ya sea uniformemente marcadas (⟷) o marcadas en un extremo (⟷) con ^{32}P y los fragmentos protegidos (P).

5.11. SECUENCIACION Y ANALISIS DE LA SECUENCIA E11BBHH16

Sabiendo que la totalidad del gen E11 se encuentra comprendido en el subclon E11BBHH16, se encaró la secuenciación del mismo.

Se llevó a cabo en la forma descripta en Materiales y Métodos, y la estrategia seguida se esquematiza en la Figura 25. La secuencia completa del subclon se muestra en la Figura 26.

Tratándose de un clon genómico de *Neurospora crassa* y contando con la certeza de que la zona codificante se encuentra interrumpida por intrones, es difícil ubicar exactamente los sitios en que comienzan y finalizan los exones para seguir un marco de lectura.

Experimentos de mapeo con nucleasa S1 indicarían que no existe protección de una banda uniformemente marcada que se extiende entre el sitio HindIII (posición 0) y el sitio NruI (posición 471), mientras que sí lo hay cuando se utiliza como sonda el fragmento NruI (de posiciones 471 a 690) uniformemente marcado por extensión de un iniciador específico sobre un subclon de M13 que contiene el fragmento HindIII (0)-BglII (708), siendo la protección de aproximadamente 170 nucleótidos (resultados no mostrados). De esto se deduce que el extremo 5´ del mRNA, codificante para esta proteína de 27 kD se encuentra acotado en esta zona de 221 nucleótidos (entre los dos sitios NruI antes mencionados).

La secuenciación se llevó a cabo en su gran mayoría por el método de los dideoxinucleótidos (Ver Materiales y Métodos), subclonando distintos fragmentos del clon E11BBHH16 en los fagos M13mp18 o M13mp19. Sin embargo, ciertas zonas difíciles de secuenciar por este método fueron a-

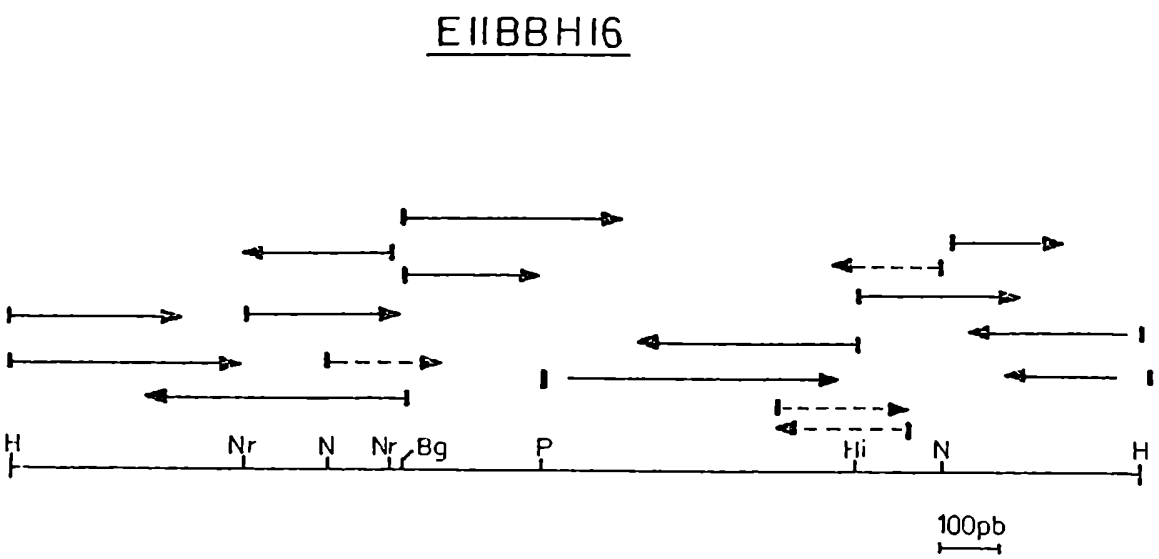


Figura 25: Estrategia de secuenciación del clon E11BBHH16

Las flechas señalan las distintas secuencias parciales estudiadas, en cada caso desde el comienzo del trazo hasta la cabeza de la flecha).
Las flechas de trazo continuo (———) corresponden a secuencias obtenidas por el método de dideoxinucleótidos utilizando subclones de E11BBHH16 en el fago M13, correspondiendo en este caso las cabezas de las flechas a los extremos 3´ de cada fragmento de secuencia.
Las flechas de trazo discontinuo (– – –) corresponden a secuencias obtenidas por el método de Maxam y Gilbert, correspondiendo en estos casos las cabezas a los extremos 5´ de cada secuencia leída.

nalizados por el método de Maxam y Gilbert, marcando los fragmentos en un extremo por *fill-in* (ver Materiales y Métodos).

Habiendo sido caracterizadas distintas secuencias consenso en *Neurospora crassa* asociadas a *capping*, comienzo de traducción, secuencias donoras y aceptoras de *splicing* de intrones, etc., se decidió estudiarlas en el gen E11.

Se ha descripto una secuencia de *capping* (unión del CAP al RNA) cerca de los extremos 5´ de los mRNA.

Esta secuencia sería del tipo PyCATTCPur, según fue descripto para otros genes eucarióticos (Sures *et al*, 1978), y se ha encontrado una secuencia similar en un gen que se expresa durante la conidiación en *Neurospora crassa* (Roberts *et al*, 1988), que corresponde a PyCATCAPur. En el clon E11BBHH16 se ha encontrado una única secuencia que corresponde a esta secuencia consenso, en la posición 455 del clon. Sin embargo, ninguna conclusión puede sacarse, aunque es sugestiva por resultados a describirse más adelante.

Respecto a la secuencia de comienzo de traducción, ha sido descripta la necesidad de una secuencia determinada inmediatamente adyacente al codón de iniciación (Kozak, 1986). Esta secuencia estaría conservada en eucariotes superiores donde es GCC$_A$CCATGG (Kozak, 1987) y en *Neurospora crassa*, en que según un consenso de 20 genes sería $_A$TCA$_A$AATGG.

En el clon E11BBHH16 se han encontrado 10 secuencias con homología mayor al 70% con el consenso descripto para *N. crassa* en posiciones 165, 219, 228, 687, 780, 1390, 1656, 1682, 1832 y 1944. Sin embargo, cuando se compara con el consenso de eucariotes, se encuentra que hay una secuencia en la posición 609 que tiene un 80% de homología con dicho consenso (ver Figura 26).

Si se estudian con atención los marcos de lectura, se observa que luego de la metionina de la posición 614 (correspondiente al consenso de comienzo de traducción de la posición 609), habría 10 aminoácidos y luego un codón de terminación que se encuentra incluído en una secuencia donora de *splicing*, cuyo consenso fue descripto como GTA▲GT para *N. crassa* (Roberts *et al*, 1988), y que tiene 100% de homología con la secuencia mencionada del clon E11BBHH16 en la posición 650. Por otro lado, este sitio de *splicing* se encontraría 190 nucleótidos *downstream* del sitio NruI (posición 471) con lo cual sería razonable el resultado de protección obtenida usando el fragmento NruI-NruI como sonda. Sin embargo, este resultado no permite asegurar que dicha secuencia corresponda realmente al codón de iniciación de traducción de la proteína, aunque si se toma el sitio de comienzo de transcripción como el correspondiente a la posición 465, el exón correspondiente tendría por lo menos 195 pb, lo que no daría un valor muy distinto al que se encontró para una de las zonas protegidas cuando se usó la ribosonda correspondiente a todo el clon (Figura 22).

Respecto al sitio donde terminaría el intrón, nada se puede afirmar. Se ha encontrado un consenso interno de intrones que es para *Neurospora crassa* del tipo ▲CT▲AC y 6 a 20 nucleótidos *downstream* el sitio aceptor de *splicing* ▼AG (Roberts *et al*, 1988). Por los resultados de la Figura 22, es muy probable que exista otro exón de aproximadamente 50-60 bases, y el mismo no se descartaría por el análisis de la secuencia, ya que existen varias combinaciones de sitios posibles donor-aceptor que darían un exón de ese tamaño.

Es sorprendente la presencia de un marco de lectura que va desde el nucleótido 1114 hasta el 1564, habiendo en el sitio 1111 una secuencia con 85% de homología con el con-

senso interno de los intrones de *Neurospora crassa* y 20 nucleótidos después un posible sitio aceptor de *splicing*. Sin embargo, habría un tracto de A (1123-1133) que no es típico de extremos 3´ de intrones, y en todo caso está descripto en eucariotes superiores la existencia de un tracto de pirimidinas (Padgett *et al*, 1986), aunque ningún consenso se extrae del análisis de los intrones de los genes estudiados de *Neurospora crassa*.

En cambio, está descripto que las secuencias hasta ahora analizadas de *N. crassa* carecerían de la señal típica de poliadenilación (AATAAA), pero en cambio se ha encontrado una secuencia muy común en el extremo 3´ de genes eucarióticos, que es TTTTCCCTCC (Benoist *et al*, 1980). Una secuencia de ese tipo ha sido descripta en el extremo 3´ del gen de metalotioneína de *N. crassa* (Münger *et al*, 1985) y en el gen que se expresa durante la conidiación en *N. crassa* (Roberts *et al*, 1988). En el clon E11BBHH16 se encuentra una secuencia con un 80% de homología con este consenso en la posición 1885, que coincidiría con la zona (1877-1910) correspondiente al extremo 3´ del gen mapeado por protección a nucleasa S1.

Los tamaños de los extremos 3´ no codificantes de los genes secuenciados son variables y, en muchos casos, no han sido analizados; pero, por ejemplo, en *Neurospora crassa* para la metalotioneína sería de aproximadamente de 220 nucleótidos (Münger *et al*, 1985), para el gen de conidiación sería de aproximadamente 240 nucleótidos (Roberts *et al*, 1988), y para la lacasa sería de aproximadamente 290 nucleótidos (Germann *et al*, 1988). En nuestro caso, si seguimos el marco de lectura abierto antes descripto, sería de 325 nucleótidos.

Por mapeo S1 se determinó asimismo, que muy posiblemente exista un exón de aproximadamente 770 nucleótidos en el extremo 3´ (resultados no mostrados), estando por lo tanto acumulados los posibles intrones en la mitad del mRNA correspondiente al extremo 5´, tal como se ha descripto que suele ocurrir en *Neurospora crassa* (Ver Introducción).

```
1           11          21          31          41          51
*           *           *           *           *           *
AAGCTTTAGG aGGCGGTAAT GGGGTCGGGT AGACGTAGAG GATAGCTTCC ATgTCGCTGT
61          71          81          91          101         111
*           *           *           *           *           *
AACATAGTGG GCTGTGTGGC AAGCCTTTTG CCATCCCGAG GGTGGCTAGG CACTGCTCGC
121         131         141         151         161         171
*           *           *           *           *           *
GTAGCCTTAC GAGGATTGCT CCAAAGTGTC TGAGTCACCG GTGATTGAAA ATGAAATTGT
181         191         201         211         221         231
*           *           *           *           *           *
ATCGATGCAA GTGCACTAGA ATTTCGACAA ACTCATACTT CTCGATGGCA AAAATGGAAG
241         251         261         271         281         291
*           *           *           *           *           *
GGTTTGAGTA GAGAGGTTGG GTTGGTAAGC CGCATGTATG GCTCCATGTC TTGTTGTTGA
301         311         321         331         341         351
*           *           *           *           *           *
AGGCAAGTAC TGGTACATAC ATCTGTAAGG GTCTTGGTAC CGCTTCCAAA GCTGTGTGGT
361         371         381         391         401         411
*           *           *           *           *           *
TCTTCCTCAG TCCAGATTCC AGATTTGATA GCGCCCCACT TTACACATAG CCTGGAGTCT
421         431         441         451         461         471
*           *           *           *           *           *
GAATCCAGAT TATATTTTCC TTCCATCGCC CACCCCACCA GTCGTCATTC GCGAACGGCA
481         491         501         511         521         531
*           *           *           *           *           *
AAACGGCATT CTATACCTCC AATCTCCATT GCTTCAGTCG CATAAACTCA ATCTCTCCGT
541         551         561         571         581         591
*           *           *           *           *           *
CTCTATCGGA ATACCACTTC ACCCACCAAG TAAAGGAAGC CCACTAGGAG CACTACACAA
601         611         621         631         641         651
*           *           *           *           *           *
GAAGAACCGA AGCCATGGCT GTCCGCGCCC AGTTCGAGAA CTCCAACGAG TAAGTTTTGC
661         671         681         691         701         711
*           *           *           *           *           *
TTGGCCTCCA CGTTCCGAGA TGGGGAATCG CGATGCGAAA ATCGAAGATC TGCCCCGCCT
721         731         741         751         761         771
*           *           *           *           *           *
GCCACCGACG ACGACATCAA TACCATGCTT CGACACCGCG ACAGCAAGGC GACTCTTGAA
781         791         801         811         821         831
*           *           *           *           *           *
TCTGAATGGG GGGCGGAGGG TAGTTCTTCG GGATATCAAG TAGCAGACGC GCTAACATTG
841         851         861         871         881         891
*           *           *           *           *           *
TCTGCTTTCT CAATAGGGTT GGAGTCTTTT CCACACTTAC AAACTCTTAC GCTTTGGTCG
901         911         921         931         941         951
*           *           *           *           *           *
CCGTCGGTGC CAGCGAAAAC TTTTACAGCG TCTTCGAGGC CGAACTCCAA GATGTTATCC
961         971         981         991         1001        1011
*           *           *           *           *           *
CTATCTGCAG AACCACCATT GCCGGCACAA GAATCATCGG TCGCTTGACA GCTGGGTAGG
```

Figura 26: Secuencia del clon E11BBHH16

La secuenciación del mismo se llevó a cabo por los métodos de Maxam y Gilbert o de dideoxinucleótidos. La secuencia aquí mostrada corresponde a la cadena codificante.

```
1021        1031        1041        1051        1061        1071
*           *           *           *           *           *
CGCTTCTTCC CTCTGCATTT TTGATTGAAC TTTTAGTCCC AAGTATCGGA GGGGGCGCAA
1081        1091        1101        1131        1121        1131
*           *           *           *           *           *
CCGAGAACCT GATTATGGGA CATTGGTAAG CTAACCACGA GTAAAAAAAA AAATTACAGT
1141        1151        1161        1171        1181        1191
*           *           *           *           *           *
AACCGCAAAG GTCTCCTCGT CCCACTACCA CAAGCGACCA GGAACTGCAA CATCTGCGCA
1201        1211        1221        1231        1241        1251
*           *           *           *           *           *
ACAGTCTCCC CGACGACGTG CGCATACAAC GTATCGAGGA GCGCCTGTCG GCCCTGGGCA
1261        1271        1281        1291        1301        1311
*           *           *           *           *           *
ACGTGATTGT GTGCAACGAC CACACGGCGC TGATCCACCC GGATCTGGAG CGCGAGACCG
1321        1331        1341        1351        1361        1371
*           *           *           *           *           *
AAGAGATCAT TGCCGACGTG CTCGGTCGAG GTGTTCCGCC AGACCATTGC CGACAACGTG
1381        1391        1401        1411        1421        1431
*           *           *           *           *           *
CTCGTCGGTA GCTACATGGC GCTCAGCAAC CAGGGCGGCT CGTTCACCCC AAGACATCCA
1441        1451        1461        1471        1481        1491
*           *           *           *           *           *
TCCAGGACCA GGACGAGCTC AGCTCCCTGC TCCAGGTACC GCCGGTGGCC GGCTCCGTCA
1501        1511        1521        1531        1541        1551
*           *           *           *           *           *
ACAGAGGTTC CAACGTCATC GGCGGTGGCA TGGTGGTCAA CGACTGGATG GCCGTCACTG
1561        1571        1581        1591        1601        1611
*           *           *           *           *           *
GTCTTGATAC TACGGCGCCC GAGCTGAGTG TTATCGAGAG CGTGTTCAGG TTAGGAGAGG
1621        1631        1641        1651        1661        1671
*           *           *           *           *           *
GTGCCGCGCC TGGCCAGATC AACTCCAGCC TCAAGGATAC CATGGTCGAG TCTTTCTACT
1681        1691        1701        1711        1721        1731
*           *           *           *           *           *
AAATCCAATG GTTTTTCTTT TGTGGGCTTG TTTTGGAGTT GGTGTTATCT GTGCTTGGTA
1741        1751        1761        1771        1781        1791
*           *           *           *           *           *
GGCAAGGAGA AAGGAAGGCA ATGTGTGAGG CAGGAGGGAG CGGAGGCGAG AGATGGATGT
1801        1811        1821        1831        1841        1851
*           *           *           *           *           *
GTAGGAGGCG GGATTCTTGT CAGGTATACC AACGACAATG GGTCGTTTCT GACATGCATG
1861        1871        1881        1891        1901        1910
*           *           *           *           *           *
CTCAAGCGTG AGCAAACAAG GCGATTTTTC TTCCAATGAA TGGTTCCTAT GACTGGCGTT
1921        1931        1941        1951        1961        1971
*           *           *           *           *           *
TTTGCGTGAG GATATGGATA TGTGTGAAGA TGACCGTGGT TGCTTGATAC TACGGCGCCC
1981        1991
*           *
GAGCTGAGTG TTAT
```

Figura 26 (continuación)

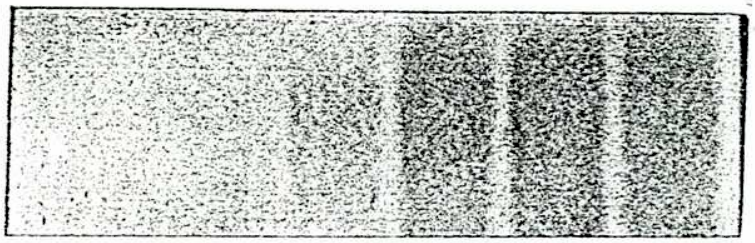
5.12. EXPRESION TEMPORAL DE LOS GENES E11 Y E29

La aparición de los transcriptos correspondientes a los genes E11 y E29 se analizó en *Northern blots* de RNA total extraído a distintos tiempos luego del tratamiento con el inhibidor (Figura 27).

Los mismos fueron hibridados con los subclones E11BBHH16 o E29BBEH17 marcados por extensión al azar (Materiales y Métodos).

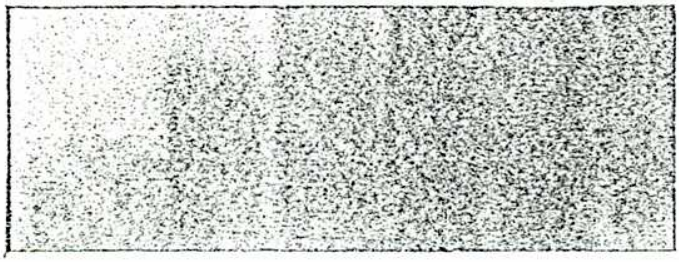
Se observa que los mensajeros correspondientes a las proteínas de 31 kD y 27 kD ya se encuentran presentes 30 minutos luego del agregado del inhibidor. Estos resultados son concordantes con los descriptos en la Sección 5.1, analizando los polipéptidos inducidos por el tratamiento con cicloheximida. Resultados no mostrados demostrarían asimismo, que el mensajero correspondiente a la proteína de 70 kD aparece también dentro de la primera hora de tratado el micelio con el inhibidor. Esto clasificaría a estas proteínas en un grupo diferente de proteínas inducibles por cicloheximida, ya que aquéllas hasta el momento descriptas aparecerían recién luego de 24 o más horas de agregado el antibiótico (Ver Introducción).

A



1 2 3 4 5 6

B



1 2 3 4 5 6

Figura 27: Expresión temporal de los mRNA luego del tratamiento con 2 µM cicloheximida

Northern blots correspondientes a mRNA (50 µg por carril) extraídos de cultivos tratados por 1) 0 hora, 2) 30 min, 3) 60 min, 4) 120 min, 5) 240 min, o 6) 360 min con 2 µM cicloheximida.
Filtros idénticos fueron hibridados con A) E29BBEH17 o B) E11BBHH16 marcados por extensión al azar.
Exposición de 6 días a -70°C con pantalla intensificadora.

5.13. INDUCCION DE LOS GENES CLONADOS POR OTRAS CONDICIONES DESFAVORABLES

5.13.1. Efecto producido por ayuno

Teniendo en cuenta que la característica principal de estos genes es la capacidad de inducirse en condiciones de inhibición de la síntesis proteica, se decidió estudiar el efecto del ayuno sobre la expresión de dichos mensajeros.

Ya se había descripto que por agotamiento de los nutrientes no se produce la inducción del mRNA correspondiente a la proteína de 70 kD (Aisemberg, 1987). Sin embargo, en esta condición no se produciría una inhibición brusca de la síntesis proteica, si bien la misma llegaría a ser tanto o más efectiva que la que se logra tratando con 2 µM cicloheximida.

Por esta razón se eligió como condición de ayuno, el pasaje de micelios de fase estacionaria a buffer fosfato de sodio, tal como se ha descripto para la inducción de la tirosinasa y otras enzimas (Ver Introducción).

Un cultivo de *Neurospora crassa* de 60 horas se filtró, lavó y se incubó en buffer fosfato de sodio 100 mM pH 6,0 por 12, 24, 48 o 72 horas, tiempo al cabo del cual se procesó como se describió en Materiales y Métodos.

Se analizó en *Northern blots* el RNA total obtenido de los micelios tratados en estas condiciones, y se hibridó con los plásmidos E11BBHH16 y E29BBHE17 o pGem 2-30A (gentileza del Dr. Aisemberg), todos ellos linealizados y marcados por extensión al azar con ^{32}P (Ver Figura 28).

Allí se compara el efecto del tratamiento sobre la expresión de los genes en cuestión, y se demuestra que existe una inducción considerable, luego de 12 horas en buffer

A

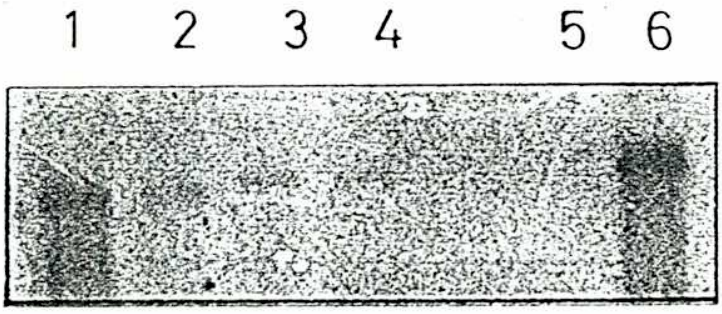
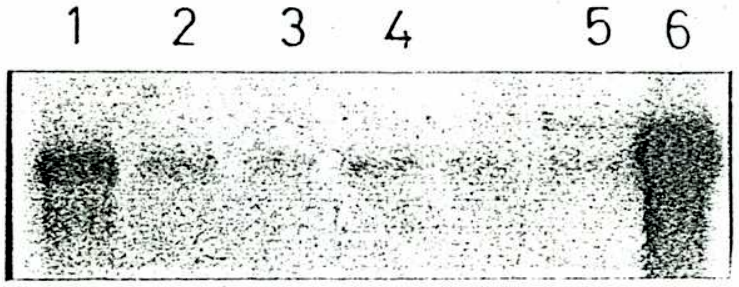


Figura 28: Efectos del ayuno sobre la expresión de los genes en estudio

Northern blots correspondientes a RNA total (20 µg por carril) obtenidos de cultivos crecidos por 60 hs en medio Vogel N/2 y 0,5% sacarosa, y sometidos luego a distintos tratamientos. Los carriles 1) a 4) corresponden a RNA extraídos de cultivos ayunados por 1) 12 hs, 2) 24 hs, 3) 48 hs, 4) 72 hs en buffer fosfato 100 mM, pH 6,0. El carril 5) corresponde a RNA de un cultivo sin tratamiento alguno y el carril 6) corresponde a RNA inducido por 6 horas con 2 µM cicloheximida.
Se hibridaron 3 filtros idénticos con A) E29BBEH17, B) E11BBHH16, y C) pGem 2-30A marcados por iniciación al azar, en todos los casos.
Exposición de 3 días a -70°C con placa intensificadora.

B.



C.

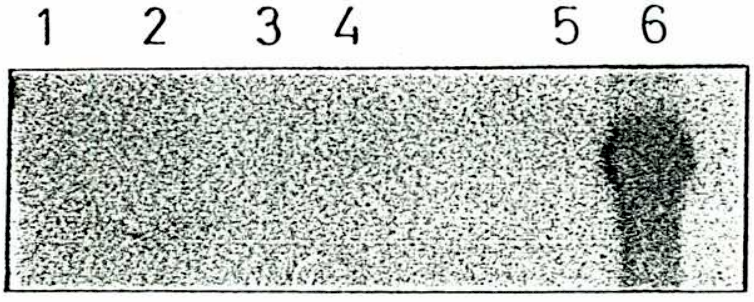


Figura 28: (Continuación)

fosfato tanto para el gen E11 como para el E29, mientras que no se observa expresión alguna del transcripto correspondiente a la proteína de 70 kD.

Asimismo, puede observarse que el máximo de inducción se obtuvo en las primeras horas de ayuno para E11 y E29. Esto confirma la clasificación de estas proteínas entre las más tempranas en la respuesta a la inhibición parcial de la síntesis de proteínas. Puede observarse también que la inducción obtenida a las 12 horas para el ayuno es mucho menor que la obtenida por el tratamiento de 6 horas con cicloheximida.

Es sorprendente el hecho de que los mRNAs correspondientes a los genes E11 y E29 prácticamente desaparecen 12 horas luego de haber sido detectados en cantidad abundante (Figura 28), lo cual sugiere que en estas condiciones de ayuno la velocidad de degradación de estas secuencias inducibles, debe ser alta.

A su vez, el hecho de que la secuencia que codifica para la proteína de 70 kD no se induzca en estas condiciones plantea la interesante alternativa de que el mecanismo regulatorio de estas secuencias inducibles por cicloheximida no sea igual para todos los genes, aunque no es descartable el hecho de que la acumulación de los distintos mRNAs inducibles no esté sincronizada.

5.13.2. Efectos producidos por alteraciones en la biosíntesis de poliaminas

Si bien la función específica de las poliaminas es incierta, se les ha asignado un rol fundamental en la replicación de DNA, en la transcripción y en distintos fenómenos

asociados a la biosíntesis de proteínas, habiéndose encontrado que alteraciones en el camino biosintético de estos metabolitos afectan el crecimiento del organismo. Asimismo, se ha propuesto que la cicloheximida sería capaz de inducir independencia de las poliaminas en el crecimiento y división de fibroblastos (Ver Introducción). Con estos antecedentes, se decidió estudiar qué efectos producía la deficiencia de poliaminas en la expresión de los genes inducibles por cicloheximida, ya sea en la cepa salvaje (StL74) o en una cepa mutada en la ornitina decarboxilasa (spe-1) cuyo crecimiento se encuentra casi totalmente impedido si no se agregan poliaminas exógenamente, siendo igualmente efectivas espermidina, putrescina o espermina, sabiendo que el agregado de espermidina no es capaz de restaurar los niveles de putrescina (Paulus *et al*, 1982).

Se analizaron por lo tanto, cultivos de *Neurospora crassa* StL 74 (cepa salvaje) crecidos en medio Vogel N con 2% sacarosa, ya sea en presencia de 1 mM espermidina (1), sin agregado alguno (3) o en presencia de 2,5 mM DFMO (Ver Introducción) y 1 mM espermidina por 36 horas (2) o de la cepa spe-1 (ODC-, Ver Materiales y Métodos) en medio Vogel N con 2% sacarosa y 1 mM espermidina por 36 horas (4). Al cabo de este tiempo, al cultivo 3 se le agregó DFMO hasta una concentración final de 2,5 mM y luego se incubaron todos los cultivos por otras 24 horas.

Pasado este tiempo (60 horas en total), se tomaron alícuotas para marcar con L-^{35}S metionina en las condiciones descriptas (Ver Materiales y Métodos), y el resto del cultivo se usó para purificar RNA total.

Con la fracción del cultivo que se incubó con L-^{35}S metionina se analizó incorporación a material TCA precipitable y el perfil de proteínas en PAGE-SDS.

Los resultados del análisis de incorporación de L-^{35}S metionina se muestran en la Tabla III. Estos valores indicarían que el agregado de DFMO, en concentración final 2,5 mM final es capaz de producir una merma en la incorporación de L-^{35}S metionina respecto al control sin tratamiento. Esta disminución de aproximadamente un 40% no puede atribuírse únicamente a un efecto sobre la inhibición de la síntesis de proteínas, sino también indirectamente a través de otros procesos metabólicos en que estarían involucradas las poliaminas.

El tiempo de 24 horas sería suficiente para producir una gran disminución en las concentraciones de poliaminas al inhibir la ODC, ya que se sabe que *N.crassa* no tiene un camino alternativo de biosíntesis de putriscina (Paulus *et al*, 1982) y 2,5 mM DFMO es una concentración aún excesiva para inhibir totalmente la actividad ODC de eucariotes superiores (Medrano *et al*,1986).

Se observa asimismo, que la incorporación de L-^{35}S metionina está disminuída en la cepa deficiente en ODC, aunque se le agregue 1 mM espermidina. Este resultado podría indicar que dicho cultivo fue capaz de alcanzar la fase estacionaria antes que el control por ejemplo, por agotamiento de la espermidina agregada exógenamente. Sin embargo, no se observa esta diferencia en el caso de la cepa salvaje cultivada desde el comienzo en presencia de DFMO 2,5 µM, condiciones que la harían fenotípicamente idéntica a la cepa carente de ODC (spe-1).

Sin embargo, es de destacar que en este cultivo se observó un tiempo de *lag* de alrededor de 12-18 horas mayor que para los otros, lo que podría significar que mientras aquellos cultivos se encontraban a las 60 horas en fase exponencial tardía, éste aún estaba en fase exponencial.

cepa	crecida 36 horas con el agregado de:	Incubada por otras 24 horas con:	% incorporación L-^{35}S metionina
StL74	1 mM espermidina		100%
StL74		2,5 mM DFMO	62%
StL74	1 mM espermidina 2,5 mM DFMO		96%
spe-1	1 mM espermidina		72%

Tabla III: % de inhibición de la síntesis proteica para las cepas salvaje y spe-1 en distintas condiciones.

Sin embargo, no se puede explicar por qué tardaría más tiempo en dispararse el crecimiento en este cultivo de la cepa salvaje en presencia de 2,5 mM DFMO y 1 mM espermidina.

El análisis de los extractos provenientes de los 4 cultivos luego del marcado con L-^{35}S metionina, por PAGE-SDS, demuestra la ausencia de diferencias significativas entre los cultivos 1 y 2, aunque sí las habría con el 3.

En cuanto a la cepa mutante (4), las diferencias con la cepa salvaje (1) no son muy marcadas.

El tratamiento de 24 horas con 2,5 mM DFMO (3) luego de 36 horas de cultivo en ausencia del inhibidor de la ODC induciría la síntesis de al menos 3 polipéptidos, claramente

ausentes en los otros cultivos, a saber de 27 kD, 31 kD y 99 kD (Figura 29). Estos polipéptidos coinciden en tamaño con los descriptos como inducibles por inhibidores de la síntesis de proteínas (Ver secciones anteriores).

Se observa también una disminución considerable en la síntesis de dos polipéptidos característicos de la fase exponencial (40 kD y 33 kD)(Ver Sección 5.3), disminución que también sería observable en el cultivo (4), coincidentemente con una menor incorporación de L-^{35}S metionina.

Se analizó el efecto producido por los distintos tratamientos sobre la expresión de los mRNA correspondientes a los genes E11 y E29, y al gen codificante para la proteína de 70 kD (Aisemberg *et al*, 1988).

Para ello se purificó RNA de los distintos cultivos y se corrieron *Northern blots* idénticos que fueron hibridados con las diversas sondas marcadas por iniciación al azar (Ver Materiales y Métodos).

Se observa que el tratamiento con DFMO 2,5 mM por 24 horas de un cultivo de 36 horas de la cepa salvaje, produce una inducción considerable de los 3 transcriptos estudiados que, salvo en el caso del gen E29, no es comparable a la que se obtiene por un tratamiento de 6 horas con cicloheximida (Figura 30) a pesar de observarse un grado de inhibición comparable en la incorporación de L-^{35}S metionina.

Para los mRNAs correspondientes a las proteínas de 70 kD y 31 kD, ninguna de las otras condiciones fue capaz de inducir su acumulación.

Sin embargo, se observaría un aumento considerable de la expresión del mRNA correspondiente al gen E11 (proteína de 27 kD), tanto en el cultivo de la cepa salvaje crecido en presencia de DFMO y espermidina como de la cepa deficien-

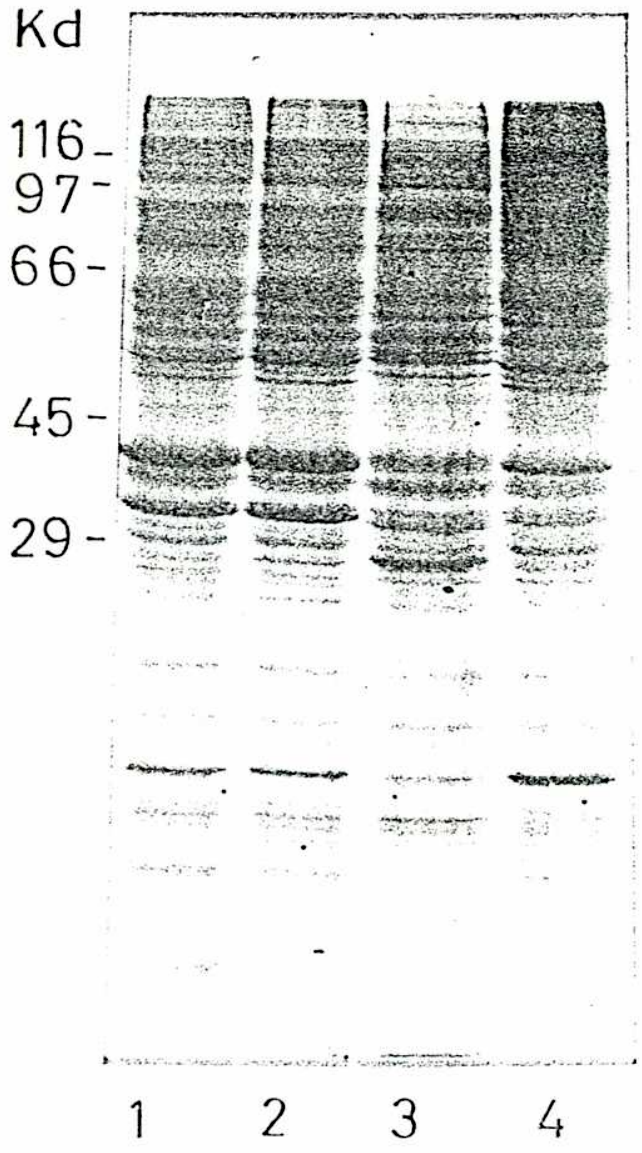


Figura 29: Efecto de la deficiencia de poliaminas en la inducción de proteínas

12% PAGE-SDS de proteínas marcadas con L-^{35}S metionina (aproximadamente 10^5 cpm por carril). Los carriles 1) a 4) corresponden a los cultivos homónimos, como se detalla en el texto.
Exposición de 7 días.

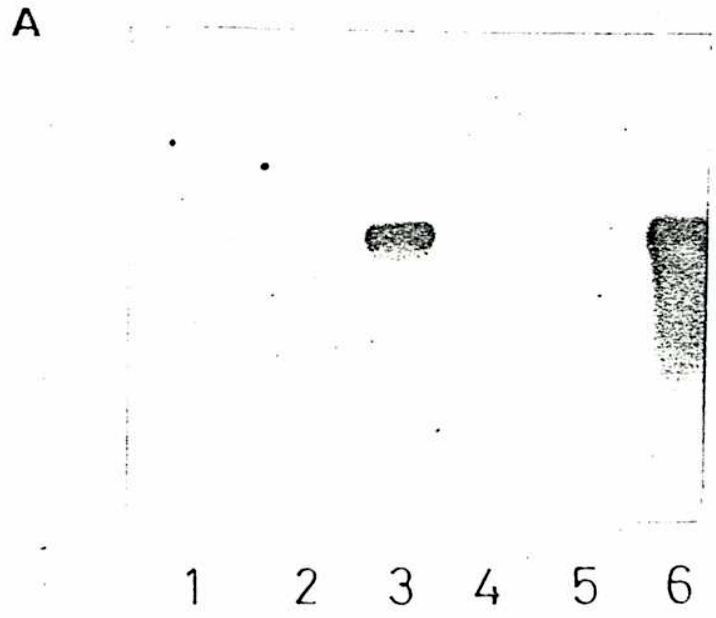
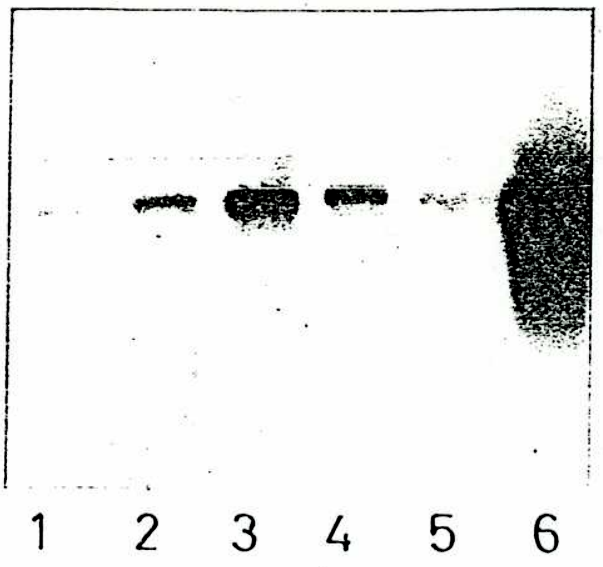


Figura 30: Efecto de la deficiencia de poliaminas sobre la expresión de los mRNA

Northern blots correspondientes a RNA total (20 µg por carril). Los carriles 1) a 4) corresponden a RNA de los cultivos llamados con el mismo nombre en el texto.
Los otros carriles corresponden a la cepa salvaje cultivada 60 horas en Vogel N/2, 0,5% sacarosa sin agregado alguno (carril 5) o tratada luego por 6 horas con cicloheximida 2 µM (carril 6).
Los 3 filtros fueron hibridados con A) E29BBEH17, B) E11BBHH16, o C) pGem 2-30A marcados por iniciación al azar. Exposición de 4 días a -70°C con pantalla intensificadora.

B



C

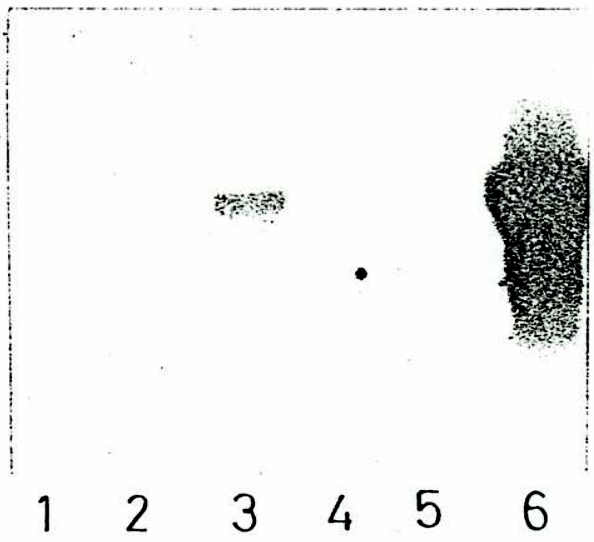


Figura 30: (Continuación)

te en ODC crecida en medio con espermidina (Figura 30.B), aunque menor a la obtenida por tratamiento con DFMO luego de 36 horas de crecimiento (Ver discusión anterior).

Si bien no resulta obvia la relación entre las condiciones de cultivo y la expresión de este gen, no puede descartarse que sea la acumulación de algún metabolito, o la falta de algún producto, la que dispara la inducción del mismo.

Sin embargo, dicha inducción no parecería acompañar la típica inhibición de la síntesis de proteínas que fue la característica general de la expresión de estos genes encontrada hasta el momento. Se plantea además, la primera diferencia en la regulación de la expresión de los genes E11 y E29.

5.13.3. Otras condiciones estudiadas

Se analizó la posibilidad de que otras condiciones desfavorables fueran capaces de inducir los genes E11 y E29.

Se estudió el efecto del *heat shock*. Se llevó a cabo sobre micelios crecidos por 60 horas a 30°C por un calentamiento rápido de 60 minutos a 45°C (Kapoor y Lewis, 1987) y se verificó por marcación *in vivo* y traducción *in vitro* de los RNA polyA+ correspondientes a la inducción de las *heat shock proteins*. Sin embargo, no se pudo encontrar expresión de los genes E11 y E29 cuando se hibridaron *Northern blots* de RNA de estas condiciones con los clones correspondientes, tal como fue descripto para el gen que codifica para la proteína inducible por cicloheximida de 70 kD (Aisemberg, 1987).

La ausencia de expresión se verificó de la misma manera en micelios sometidos a "shock salino" por pasaje a medios de alta concentración de NaCl (500 mM a 1 M), o por cambios bruscos de pH, habiéndose probado pH 4,0; pH 8,0 y pH 12,0; o por enfriamiento del cultivo a 4°C. Los tiempos estudiados fueron 6 horas y 24 horas luego del tratamiento en todos los casos. Sin embargo, nó ha sido descripto que ninguna de estas condiciones sea capaz de ejercer un efecto inhibitorio directo sobre la maquinaria biosintética de proteínas, tal como ocurre en los casos en que se verificó inducción de los genes E11 y E29.

6. C O N C L U S I O N E S

Conclusiones

En este trabajo se describen algunos de los efectos inmediatos asociados a la inhibición parcial de la síntesis de proteínas producida por cicloheximida, así como ciertas características de algunos genes que no se expresan durante el crecimiento vegetativo, pero que sí lo hacen en forma muy aumentada inmediatamente después del bloqueo de la síntesis proteica por dicho inhibidor.

El clonado de dos de dichos genes (Tabla IV) permitió encarar el estudio de otras condiciones que producen un efecto similar sobre la síntesis proteica, demostrándose que la inducción de los mismos ocurre frente a varias situaciones de stress que involucran la inhibición general de la traducción, a diferencia de lo que sucede por shock térmico, situación en la cual se produce una inhibición selectiva de la traducción de algunos mRNAs. Por otra parte, el *heat shock* no induce la acumulación de transcriptos correspondientes a dichos genes clonados.

Se encontró, sin embargo, que la inhibición con cicloheximida es la que produce el mayor incremento de dichos mRNAs entre las distintas condiciones de "stress" estudiadas, inclusive a valores comparables de inhibición de la síntesis proteica.

La relación entre estos genes que se inducen en forma temprana y aquellos que lo hacen luego de 24 horas de comenzado el tratamiento, no es obvia a partir de los resultados aquí descriptos, no pudiendo descartarse que ambos grupos de genes estén regulados negativamente por un represor común de alto recambio tal como fue propuesto para los de expresión más tardía (Horowitz *et al*, 1970) o alternativamente, que aquellos polipéptidos que se expresan inmediatamente luego del tratamiento, estén involucrados en la regulación de la expresión de los que se manifiestan más tardíamente.

Asimismo, se ha visto que la respuesta desencadenada en las primeras 6 horas de tratamiento con 2 µM cicloheximida es suficiente para inducir la tolerancia a concentraciones mayores del inhibidor (Grotewold *et al*, 1988), lo que no descartaría que alguno/s de los genes aquí descriptos esté relacionado con dicha "adaptación" a la inhibición parcial de la síntesis proteica.

El análisis de la secuencia de uno de los genes clonados que presenta ciertas características particulares de expresión va a permitir deducir la estructura primaria de la proteína codificada por ese gen, y comparar con distintos bancos de secuencias a fin de ayudar al entendimiento de la función del mismo.

La homología encontrada entre algunos de estos genes y secuencias de otros organismos indicaría algún tipo de conservación evolutiva de las mismas, en la respuesta ante ciertas situaciones de stress ambiental.

Gen	Clon	Proteína codificada	Tamaño del RNA mensajero	Referencia
E11	E11BBHH16	27kD	1,1-1,2 kb	Esta Tesis
E29	E29BBEH16	31kD	1,1-1,2 kb	Esta Tesis
CI-1	pGem2-30A	70kD	2,3 kb	(Aisemberg *et al*,1988)

Tabla IV: Características de los genes clonados inducibles en forma temprana por cicloheximida.

AGRADECIMIENTOS:

A mis compañeros Gabriel Aisemberg, Daniel Altschuler, Ricardo Attar y Guillermo Taccioli por brindarme siempre en forma totalmente desinteresada todo su apoyo y su tiempo.

Al Dr. Norberto Judewicz por haberme dado la posibilidad de hacer esta Tesis y haber estado siempre abierto a la discusión de los problemas que se cruzaron en el camino.

Al Dr. Héctor Torres por permitirme realizar este trabajo en el INGEBI y haber sido el Director de mis Becas.

A la Dra. Mirtha Flawiá por haber estado siempre atenta a nuestras necesidades.

Al Dr. Alberto Kornblihtt por la discusión crítica de muchos resultados.

A los compañeros del INGEBI por toda la colaboración prestada.

A Adriana Urman por la dedicación y el cuidado puestos en la transcripción de esta Tesis.

7. B I B L I O G R A F I A

Adouette-Panvier, A. y J.E. Davies (1984) **Mol. Gen. Genet. 194**, 310.

Afanasieva, T. P., S. Filippovich, Yu. y M.S. Kritsky (1984) **Neurospora Newsletter 31**, 19.

Aisemberg, G.O. (1987) Tesis Doctoral, U.B.A.

Aisemberg, G.O., E. Grotewold, G.E. Taccioli y N.D. Judewicz (1988) Exp. Mycol. En prensa.

Aisemberg, G.O., G.E. Taccioli, E. Grotewold y N.D. Judewicz (1987) **Exp. Mycol. 11**, 122-127.

Aviv, H. y P. Leder (1972) **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69**, 1408-1412.

Baeck, E., G. Feil y K. Strohmaier (1983) **EMBO J. 2**, 555.

Banerji, S.S., L. Berg y R.I. Morimoto (1986) **J. Biol. Chem. 261**, 15740-15745.

Benoist, C., K. O'Hare, R. Breathnack y P. Chambon (1980) **Nuc. Acids Res. 8**, 127-142.

Benton, W.D. y R.W. Davis (1977) **Science 196**, 180-182.

Birnboim, H.C. y J. Doly (1979) **Nucleic Acids Res. 7**, 1513-1523.

Blin, N. y B.W. Stafford (1976) **Nucleic Acids Res. 3**, 2303.

Bollag, J.M. y A. Leonowicz (1984) **App. Env. Microb. 48**, 849-854.

Bibliografía

Bond, U. y M.J. Schlesinger (1986) **Mol. Cell. Biol. 6**, 4602-4610.

Borbely, G., G. Suranyi, A. Korcz y Z. Palfi (1985) **J. Bacteriol. 161**, 1125-1130.

Burkhard, S.J. y J.A. Traugh (1984) **Fed. Proc. 43**, 177.

Cohen, B.L., J.E. Morris y H. Drucker (1975) **Arch. Biochem. Biophys. 169**, 324-330.

Cohen, L.B. y H. Drucker (1977) **Arch. Biochem. Biophys. 182**, 601-613.

Courteidge, S.A. y J.M. Bishop (1982) **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79**, 7117-7121.

Cruz, A.K. y H.F. Terenzi (1981) **Neurospora Newsletter 28**, 8.

Curle, C.A. y M. Kapoor (1987) **Genet. Soc. Can. Bull. 18**, 90 (Abstr).

Davis, R.H. y F.J. de Serres (1970) **Meth. Enzymol. 17**, 79-143.

Davis, R.H., G.N. Krasner, J.J. Di Gangi y J.L. Ristow (1985) **Proc. Natl. Acad. Sci.82**, 4105-4109.

de Benedetti, A. y C. Baglioni (1986) **J. Biol. Chem. 261**, 15800-15804.

DeBusk, R.M. y S. Ogilvie (1984) **J. of Bacteriol. 160**, 493-498.

Duncan, R. y E. McConkey (1982) **Eur. J. Biochem. 123,** 535-538.

Ernest, M.J., L. DeLap y P. Feigelson (1978) **J. Biol. Chem. 253,** 2895-2897.

Eversole, P., J.J. Di Gangi, T. Menees y R.H. Davis (1985) **Mol. Cell. Biol. 5,** 1301-1306.

Finley, D. y A. Varshavsky (1985) **Trends Biochem. Sci. 10,** 343-347.

Finley, D., A. Ciechanover y A. Varshavsky (1984) **Cell 37,** 43-55.

Froehner, S.C. y E. Eriksson (1974) **J. Bacteriol. 120,** 450-457.

Germann, U.A., G. Müller, P.E. Hünziker y K. Lerch (1988) **J. Biol. Chem. 263,** 885-896.

Glass, N.L., S.J. Vollmer, C. Staben, J. Grotelneschen, R.L. Metzenberg y C. Yanofsky (1988) **Science 241,** 570-573.

Goff, S.A. y A.L. Goldberg (1985) **Cell 41,** 587.

Graham, J.D. (1967) **Neurospora Newsletter 11,** 14.

Grotewold, E., G.E. Taccioli, G.O. Aisemberg y N.D. Judewicz (1988a) MIRCEN J. App. Microbiol. Biotech. En prensa.

Grotewold, E., G.E. Taccioli, G.O. Aisemberg y N.D. Judewicz (1988b) Enviado para su publicación.

Hasunuma, K.A., A. Toh-E y T. Ishikawa (1976) **Biochim. Biophys. Acta 432,** 223-236.

Hasunuma, K. y T. Ishikawa (1977) **Biochim. Biophys. Acta 480**, 178-193.

Hirsch, H.M. (1954) **Physiol. Plantarum 7**, 72-97.

Horowitz, N.H. (1965) **Bioch. Biophys. Res. Commun. 18**, 686-692.

Horowitz, N.H. y S.C. Shen (1952) **J. Biol. Chem. 197**, 513-520.

Horowitz, N.H., H. Macleod Feldman y M.L. Pall (1970b) **J. Biol. Chem. 245**, 2784-2788.

Horowitz, N.H., M. Fling, H. Macleod Feldman, M.L. Pall y S. C. Froehner (1970a) **Devel. Biol. 21**, 147-156.

Horowitz, N.H., M. Fling, H. Macleod y N. Sueoka (1960) **J. Mol. Biol. 2**, 96-104.

Horowitz, N.H., M. Fling, H. Macleod y Y. Watanabe (1961) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **26**, 233.

Hsu, K.S. (1963) **J. Gen. Microbiol. 32**, 341-347.

Hu, N. y J. Messing (1982) **Gene 17**, 271-277.

Huebschman, C. (1952) **Mycologia 44**, 599.

Hunt, C., R, Morimoto (1985) **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82**, 6455-6459.

Kapoor, M. (1983) **Int. J. Biochem. 15**, 639-649.

Kapoor, M. y J. Lewis (1987) **Can. J. Microbiol. 33**, 162-168.

Katan, T. y E. Galun (1975) **Anal. Biochem. 67**, 485-492.

Katan, T., R. Arnon y E. Galun (1975) **J. Biochem. 59**, 387-394.

Kaufer, N.F., M.M. Fried, W.F. Schwindinger, M. Jasin y J.R. Wainer (1983) **Nuc. Acids Res. 11**, 3123-3135.

Kelly, R., D.R. Shaw y H.L. Ennis (1987) **Mol. Cell. Biol. 7**, 799-805.

Keyser, P., T. Kirk y J.G. Zeikus (1978) **J. Bacteriol. 135**, 790-797.

Kinnaird, J.H. y J.R.S. Fincham (1983) **Gene 26**, 253-260.

Kirk, T.K. (1988) Proc. of the Microbiol. Soc. Symp. N° 43, Academic Press. Inc.

Kornfeld, E.C., R.G. Jones y T.V. Parke (1949) **J. Am. Chem. Soc. 71**, 150-159.

Kozak, M. (1986) **Cell 44**, 283-292.

Kozak, M. (1987) **Nuc. Acids Res. 15**, 8125-8148.

Kreader, C.A. y J.E. Heckman (1987) **Nuc. Acids Res. 15**, 9027-9041.

Krieg, J., J. Hofsteenge y G. Thomas (1988) **J. Biol. Chem. 263**, 11473-11477.

Krumlauf, R. y G.A. Marzluf (1980) **Biochemistry 18**, 3705-3713.

Laemmli, U.K. (1970) **Nature 227**, 680.

Lampert, A. y P. Feigelson (1974) **Biochem. Biophys. Res. Commun. 58**, 1030-1038.

Leach, B.E., J.H. Ford y A.J. Whiffen (1947) **J. Am. Chem. Soc. 69**, 474.

Lehrach, H., D. Diamond, J.M. Wozney y H. Boedker (1977) **Biochemistry 16**, 4743-4751.

Lindberg, R.A. y H. Drucker (1984) **J. Bacteriol. 157**, 375-379.

Lindberg, R.A., J.S. Eirich, L. Price, L. Wolfinbarger y H. Drucker (1981) **J. Biol. Chem. 256**, 811-814.

Lindberg, R.A., W.G. Rhodes, L.D. Eirich y H. Drucker (1982) **J. Bacteriol. 150**, 1103-1108.

Lindell, T.J. y J.J. Duffy (1979) **J. Biol. Chem. 254**, 1454-1456.

Lindquist, S. (1980) **Dev. Biol. 77**, 463-479.

Loefer, J.B. y T.S. Matney (1952) **Physiol. Zool. 25**, 272.

Loenen, W.A. y W.J. Brammar (1980) **Gene 10**, 249.

Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr y R.J. Randall (1951) **J. Biol. Chem. 193**, 267.

Maas, W.K. (1972) **Mol. Gen. Genet. 119**, 1-9.

Mandel, M. y A. Higa (1970) **J. Mol. Biol. 53**, 154.

Maniatis, T., E.F. Fritsch y J. Sambrook (1982) **Molecular cloning: A laboratory manual**, Cold Spring Harbor Laboratory.

Maniatis, T., R. Hardison, E. Lacy, J. Lauer, C. O'Connell, D. Quon, D.K. Sim y A. Efstradiatis (1978) **Cell 15**, 687.

Marzluf, G.A. (1981) **Microbiol. Rev. 45**, 437-461.

Maxam, A.M. y W. Gilbert (1980) **Methods in Enzymology 65**, 497-559.

McCarthy, T.E. y M. Suvillan (1941) **J. Biol. Chem. 141**, 873.

Medrano, E.E., R.O. Burrone, M.M. Ferrer, G.A.E. Cafferata e I.D. Algranati (1986) **FEBS Let. 206**, 106-110.

Medrano, E.E., S.H. Goldemberg e I.D. Algranati (1983) **J. Cell Physiol. 117**, 141-147.

Messing, J. (1983) **Methods in Enzymology 101**, 20.

Metzenberg, R.L. (1979) **Microbiol. Rev. 43**, 361-383.

Münger, K., U.A. German y K. Lerch (1985) **EMBO J. 4**, 2665-2668.

Munro, S. y H. Pelham (1985) **Nature 317**, 477-478.

Munro, S. y H.R. Pelham (1986) **Cell 46**, 291-300.

Nahm, H.B. y G.A. Marzluf (1987) **J. of Bacteriol. 169**, 1943-1948.

Nasmyth, K. y D. Shore (1987) **Science 237**, 1162.

Ogata, W.N. (1962) **Neurospora Newletter 1**, 13.

Orbach, M.J., B.E. Porro y C. Yanofsky (1986) **Mol. Cell. Biol. 6**, 2452-2461.

Padgett, R.A., P.J. Grabowski, M.M. Konarska, S. Seiler y P. A. Sharp (1986) **Ann. Rev. Biochem. 55**, 1119-1150.

Pall, M.L. y C.K. Robertson (1988) **J. Biol. Chem. 263**,11168-11174.

Palmer, C. y T.E. Maloney (1955) **J. Sci. 55**, 1.

Parnes, J.R., B. Velan, L. Felsenfeld, L. Ramanathan, U. Ferrini, E. Apella y J.G. Sidman (1981) **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78**, 2253.

Paulus, T.J., P. Kiyono y R.H. Davis (1982) **J. Bacteriol. 152**, 291-297.

Pelham, H. (1988) **Nature 332**, 776-777.

Pelham, H.R.B. (1986) **Cell 46**, 959-961.

Pelham, H.R.B. y M. Bienz (1982) **EMBO J. 1**, 1473-1477.

Perkins, D.D. y E.G. Barry (1977) **Adv. Genet. 19**, 133-285.

Perkins, D.D., B.C. Turner y E.G. Barry (1976) **Evolution 30**, 281-313.

Plesofsky-Vig, N. y R. Brambl (1985) **J. Bacteriol. 162**, 1083-1091.

Prade, A.P. y H.F. Terenzi (1985) **Arch. Microbiol. 143**, 37-41.

Prade, R.A. y H.F. Terenzi (1985) **Arch. Microbiol. 229**, 1-5.

Rao, M., V. Deshpande, S. Keskar y M.C. Srinivasan (1982) **Enzy. Microb. Technol. 5**, 133-136.

Reinert, W.R. y G.A. Marzluf (1975) **Mol. Gen. Gen. 139**, 39-55.

Reinert, W.R., V.B. Patel y N.J. Giles (1981) **Mol. Cell. Biol. 1**, 829-835.

Roberts, A.N., V. Berlin, K.M. Hager y C. Yanofsky (1988) **Mol. Cell. Biol. 8**, 2411-2418.

Schlesinger, M., M. Asburner y A. Tissieres (1982) Heat Shock: From Bacteria to Man. Cold Spring Harbor, New York.

Schneider, W.C. (1957) **Meth. Enzymol. 3**, 680-684.

Sebald, W., A.J. Schwab y Th. Bücher (1969) **FEBS Let. 4**, 243-246.

Sharp, P.A., B. Sudgen y J. Sambrook (1973) **Biochemistry 12**, 3055.

Sher, C.L. y B.G. Dodge (1927) **J. Agric. Res. 34**, 1019.

Siegel, M.R. y H.D. Sisler (1963) **Nature 200**, 675.

Siegel, M.R. y H.D. Sisler (1965) **Biochim. Biophys. Acta 103**, 558-567.

Siegel, M.R., H.D. Sisler y F. Johnson (1966) **Biochem. Pharmacol. 15**, 1218.

Sikora, L. y G.A. Marzluf (1982) **J. Bacteriol. 150**, 1287-1291.

Sikora, L. y G.A. Marzluf (1982) **Mol. Gen. Genet. 139**, 39-55.

Sisler, H.D. y M.R. Siegel (1967) Antibiotics I: Mechanism of Action. Springer-Verlag New York Inc, 283-307.

Sorger, N. y H.R.B. Pelham (1987) **J. Mol. Biol.**, en prensa.

Southern, E. (1975) **J. Mol. Biol. 98**, 503.

Stark, R.G. y G.M. Wahl (1984) **Ann. Rev. Biochem. 53**, 447-491.

Strathern, J.N., E. Spatola, E. McGill y J.B. Hicks (1980) **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77**, 2839.

Strauss, B.S. (1958) **J. Gen. Microbiol. 18**, 658-669.

Sullia, S.B. y D.H. Griffin (1977) **Biochim. Biophys. Acta 475**, 14.

Sullia, S.B. y R. Maria (1985) **Proc. Indian Acad. Sci. 95**, 417-427.

Sures, I., J. Lowry y L.H. Kedes (1978) **Cell 15**, 1033-1044.

Sutton, C.A., M. Ares, Jr. y R.L. Hallberg (1978) **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75**, 3158.

Tabor, C.W. y H. Tabor (1984) **Ann. Rev. Biochem. 53**, 749-790.

Taccioli, G.E., E. Grotewold, G.O. Aisemberg y N.D. Judewicz (1988a) Enviado para su publicación.

Taccioli, G.E., E. Grotewold, G.O. Aisemberg y N.D. Judewicz (1988b) Enviado para su publicación.

Takagi, M., S. Kawai, Y. Takata, N. Tanaka, M. Sunairi, M. Miyazaki y K. Yano (1985)**J. Gen. Appl. Microbiol. 31**, 267-275.

Theodorakis, N.G. y R.I. Morimoto (1987) **Mol. Cell. Biol.** 7(12), 4357-4368.

Timberlake, W.E. y D.H. Griffin (1974) **Biochim. Biophys. Acta 353**, 248.

Tomsett, A.B. y R.H. Garrett (1981) **Mol. Gen. Gen. 186**, 33-39.

Työrinoja, R.K., T. Nurminen y H. Suomalainen (1974) **Biochem. J. 141**, 133.

Vogel, H.J. (1956) **Microb. Genet. Bull. 13**, 42-43.

Westergaard, M. y H.K. Mitchell (1947) **Am. J. Bot. 34**, 573.

Wettstein, F.O., M. Noll y S. Pemnan (1964) Biochim.Biophys. **Acta 87**, 525.

Whiffen, A.J. (1948) **J. of Bacteriology 56**, 283.

Whiffen, A.J. (1950) **Mycologia 42**, 253.

Whitney, P.A. y D.R. Morris (1978) **J. of Bacteriology** 134, 214-220.

Wilson, J.F. y W.K. Bates (1969) **Neurospora Newletter** 15, 18.

Wood, W.B. (1966) **J. Mol. Biol. 16**, 118.

Woudt, L.P., A. Pastnik, A.E. Kempers-Veenstra, A.E.M. Jansen, W.H. Mager y R.J. Planta (1983) **Nuc. Acids Res. 11**, 5347-5360.

Wu, C. (1985) **Nature 317**, 84-87.

Yamamori, T., K. Ito, Y. Nakamura y T. Yura (1978) **J. Bacteriol. 134**, 1133-1140.

Yamamoto, K.R., B.M. Alberts, R. Benzinger, L. Lawhorne y G. Treiber (1970) **Virology 40**, 734.

Yost, H.J. y S. Lindquist (1986) **Cell 45**, 185-193.

Erich Grotewold

Erich Grotewold

Autor

Dr. Norberto D. Judewicz

Director de Tesis